Analyse der *Bartonella henselae*-induzierten angiogenetischen Wirtszellantwort

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Maria Lebiedziejewski
aus Ludwigsburg

2005

Tag der mündlichen Prüfung:	02.06.2005
Dekan:	Prof. Dr. F. Schöffl
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. I. B. Autenrieth
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. N. Blin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Bartonella*

Die zu der Familie *Bartonellacea* gehörende Art *Bartonella bacilliformis* war bis Anfang 1990 die einzige bekannte Spezies der Gattung *Bartonella.* Lange Zeit waren nur drei Erkrankungen bekannt, die durch *Bartonella* spp. verursacht werden: Carrion´sche Erkrankung (*B. bacilliformis*), 5-Tage-Fieber / Schützengrabenfieber (*B. quintana*) und Katzenkratzkrankheit (*B. henselae*; Rolain *et al.*, 2004). Es folgte eine Reklassifizierung mittels 16S rRNA-Sequenzierung, durch die 1993 die Familie *Rochalimaea* und 1995 die Familie *Grahamella* der Familie *Bartonellaceae* zugeordnet werden konnte (Brenner *et al.*, 1993; Regnery *et al.*, 1992b; Ellis *et al.*, 1999). Seitdem werden immer wieder neue Spezies beschrieben, die aus verschiedenen Tieren isoliert wurden (Bermond *et al.*, 2002; Dehio *et al.*, 2001; Maillard *et al.*, 2004). Bisher sind 20 Arten entdeckt worden, von denen 8 als humanpathogen gelten (Kerkhoff *et al.*, 1999; Kordick *et al.*, 1996; Kosoy *et al.*, 2003) **(Tab. 1)**.

Tab. 1: Natürliches Vorkommen, Überträger und humane Erkrankungen der *Bartonella* spp. (Dehio, 2004).

***Bartonella* spp.**	**Reservoir**	**Vektor**	**Humane Erkrankungen**
Human-spezifische spp.:			
B. bacilliformis	Mensch	Sandfliege	Carrion’sche Krankheit: Oroya Fieber und Verruga peruana
B. quintana	Mensch	Körperlaus	5-Tage-Fieber, Endokarditis, Bazilläre Angiomatose
Zoonotische spp.:			
B. clarridgeiae	Katze	Katzenfloh	Katzenkratzkrankheit
B. elizabethae	Ratte	unbekannt	Endokarditis, Neuroretinitis
B. grahamii	Maus, Wühlmaus	unbekannt	Neuroretinitis
B. henselae	Katze	Katzenfloh	Katzenkratzkrankheit, Endokarditis, Bazilläre Angiomatose, Bazilläre Peliose, Neuroretinitis, Bakteriämie, Fieber
B. vinsonii subsp. arupensis	Maus	Zecke	Bakteriämie, Fieber
B. washoensis	Erdhörnchen	unbekannt	Myokarditis, Endokarditis
Tierspezifische spp.:			
B. alsatica	Hase	unbekannt	nicht beschrieben
B. birtlesii	Maus	unbekannt	nicht beschrieben

B. bovis (= B. weissii)	Rind / Katze	unbekannt	nicht beschrieben
B. capreoli	Reh	unbekannt	nicht beschrieben
B. chomelii	Rind	unbekannt	nicht beschrieben
B. doshiae	Wühlmaus	unbekannt	nicht beschrieben
B. koehlerae	Katze	unbekannt	nicht beschrieben
B. peromysci	Hirsch, Maus	unbekannt	nicht beschrieben
B. schoenbuchensis	Rotwild	unbekannt	nicht beschrieben
B. talpae	Maulwurf	unbekannt	nicht beschrieben
B. taylorii	Maus, Wühlmaus	unbekannt	nicht beschrieben
B. tribocorum	Ratte	unbekannt	nicht beschrieben
B. vinsonii subsp. berkhoffii	Hund	Zecke	Endokarditis
B. vinsonii subsp. vinsonii	Wühlmaus	Milbe	nicht beschrieben

Die Mitglieder der Gattung *Bartonella* sind fakultativ intrazelluläre Bakterien. Es handelt sich um kleine, pleomorphe, langsam wachsende, leicht gebogene gram-negative Stäbchenbakterien, die zur α-Subgruppe der Proteobakterien gehören und eng verwandt mit *Brucella* spp. sind (Birtles *et al.*, 1995; Birtles and Raoult, 1996; Maurin *et al.*, 1997). Bei *Bartonella* spp. handelt es sich um Säugetier-Pathogene mit einem engen Wirtsspektrum, die nur an einen oder wenige Tierwirte angepasst sind. Hauptsächlich werden sie durch blutsaugende Arthropoden (Flöhe, Läuse, Zecken) auf den Wirt übertragen. Die Übertragung auf den natürlichen Wirt resultiert in einer lang andauernden intraerythrozytären Bakteriämie. Eine Infektion von Fehlwirten kann zu verschiedenen klinischen Manifestationen führen (Jacomo *et al.*, 2002). Beispiel für die Infektion eines Fehlwirtes ist die Infektion des Menschen mit dem zoonotischen Erreger *B. henselae*, dessen natürlicher Wirt die Katze ist. *Bartonella* spp. können Verursacher folgender humaner Erkrankungen sein: bazilläre Angiomatose (BA), bazilläre Peliosis Hepatis (BPH), Katzenkratzkrankheit (KKK), chronische Bakteriämie, chronische Lymphadenopathie, Meningoencephalitis, Retinitis, Myelitis, granulomatöse Hepatitis, Endokarditis und Osteomyelitis (Jacomo *et al.*, 2002). Der natürliche Wirt für *B. bacilliformis* und *B. quintana* ist der Mensch. Das Krankheitsbild, das durch diese Bakterien hervorgerufen wird, entsteht durch intraerythrozytische Bakteriämie sowie durch Assoziation der Erreger mit Endothelzellen (Chomel *et al.*, 2003; Dehio, 2001; Dehio and Sander, 1999).

1.1.1. *Bartonella henselae*

1990 konnte eine neue *Bartonella*-Spezies (der Erreger der bazillären Angiomatose) als enger Verwandter von *B. quintana* identifiziert werden (Relman *et al.*, 1990). Parallel dazu wurde ein Bakterium aus dem Blut eines immunsupprimierten Patienten isoliert, das eng verwandt zu *Rochalimaea quintana* war (Slater *et al.*, 1990). 1992 konnte diese neue Spezies ebenfalls aus der Blutkultur eines HIV-positiven Patienten isoliert und charakterisiert werden, sowie die BA und BPH bei HIV-Patienten beschrieben werden (Regnery *et al.*, 1992b; Welch *et al.*, 1992). 1993 wurde diese Spezies von den *Rickettsien* abgetrennt, in *Bartonella henselae* umbenannt und in die Familie der *Bartonellaceae* eingegliedert (Brenner *et al.*, 1993). 1990 wurden *B. henselae* erstmals aus der Blutkultur von Katzen isoliert (Slater *et al.*, 1990; Regnery *et al.*, 1992a). Es handelt sich bei *B. henselae* um ein weltweit verbreitetes zoonotisches Pathogen. Das natürliche Reservoir von *B. henselae* sind Katzen, in denen es normalerweise asymptomatisch verlaufende intraerythrozytische Bakteriämien verursacht (Kordick and Breitschwerdt, 1995; Rolain *et al.*, 2001). Von Katze zu Katze wird das Bakterium durch den Katzenfloh *Ctenocephalides felis* übertragen. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt entweder durch einen Biss oder Kratzer einer Katze, kann jedoch auch durch den Katzenfloh erfolgen (Chomel *et al.*, 1996; Köhler *et al.*, 1994).

1.1.2. *Bartonella quintana*

B. quintana ist der Verursacher des 5-Tage-Fiebers bzw. des Schützengrabenfiebers und wird durch Körperläuse auf den Menschen übertragen, die das einzig bekannte Reservoir für dieses Bakterium darstellen. Die klinischen Symptome der Infektion humaner Erythrozyten mit *B. quintana* reichen von asymptomatischen Infektionen bis hin zu schweren Erkrankungen. Die klassische Manifestation ist gekennzeichnet durch periodische Fieberschübe, die durch schwere Kopfschmerzen, Schwindel, Schmerzen im Schienbein sowie einer anhaltenden Bakteriämie begleitet werden. In beiden Weltkriegen hat *B. quintana* große Epidemien unter den Soldaten hervorgerufen, während das Bakterium heute häufig bei Menschen mit schlechten hygienischen Bedingungen wie z.B. bei Obdachlosen und Alkoholikern nachgewiesen werden kann (Brouqui *et al.*, 1999; Rolain *et al.*, 2004; Maurin and Raoult, 1996; Chomel *et al.*, 2003; Kosoy *et al.*, 2003). Weiterhin ist *B. quintana* für die Entstehung von Erkrankungen wie Endokarditis, BA, BPH und Bakteriämien in immunsupprimierten Menschen (z.B. HIV-infizierten Patienten) verantwortlich (Maurin and Raoult, 1996).

1.1.3. *Bartonella bacilliformis*

B. bacilliformis kommt endemisch in den Anden vor und wird durch die Sandfliege *Lutzomyia verrucarum* übertragen (Amano *et al.*, 1997). Es handelt sich um den Erreger der biphasisch verlaufenden Carrion´schen Erkrankung. Die erste Phase (Oroya Fieber), die in vielen Fällen letal verläuft, ist durch hohes Fieber und lebensbedrohliche Septikämien gekennzeichnet, die durch massive Invasion der humanen Erythrozyten durch den Erreger hervorgerufen und zu akuter Hämolyse führen (Alexander, 1995; Benson *et al.*, 1986). Überlebt der Erkrankte die erste Phase, tritt die zweite chronische Phase (Verruga Peruana) ein. Es kommt hierbei zu einer Bildung von gutartigen vasoproliferativen Läsionen der Haut, die aus runden, häufig juckenden sowie blutenden Papeln bestehen und durch osteoartikuläre Schmerzen begleitet werden (Rolain *et al.*, 2004; Maguina *et al.*, 2001; Arias-Stella *et al.*, 1986).

1.2. Durch *B. henselae* verursachte Erkrankungen

Der Verlauf einer *B. henselae*-Infektion hängt hauptsächlich vom Immunstatus des Patienten ab. Immunkompetente Patienten erkranken bei einer *B. henselae*-Infektion an der Katzenkratzkrankheit (KKK), die gewöhnlich selbstlimitierend ist und ca. 2-3 Monate andauert (Rolain *et al.*, 2004; Maurin *et al.*, 1997). Eine Infektion mit *B. henselae* von immunsupprimierten wie auch immunkompetenten Patienten kann zur Entstehung von Endokarditis sowie zu Bakteriämien führen (Anderson and Neuman, 1997; Fournier *et al.*, 2001). Der Verlauf einer typischen KKK läuft folgendermaßen ab: 3-10 Tage nach Katzenkontakt (Katzer oder Biss) kommt es zur Entstehung einer kleinen rot-braunen Papel an der verletzten Hautstelle. Zwei Wochen nach Infektion entstehen in der Region der verletzten Hautstelle schmerzhafte und empfindliche Lymphknotenschwellungen. Atypische Erscheinungsformen der KKK können in den unterschiedlichsten Verlaufsformen auftreten. Bei der am häufigsten vorkommenden Form, dem „Parinaud'schen okuloglandulären Syndrom", ist das betroffene Auge entzündlich gerötet und stark geschwollen, zudem sind Sehstörungen möglich. Diese Erkrankung ist selbstlimitierend und heilt nach 2-4 Monaten ab (Bass *et al.*, 1997; Anderson and Neuman, 1997). Neben der typisch und atypisch verlaufenden KKK wurde ebenfalls eine systemische Verlaufsform beschrieben, bei der die Symptome über einen längeren Zeitraum hinweg persistieren und durch hohes Fieber,

Nachtschweiß, Krankheitsgefühl, Müdigkeit, Gewichtsverlust, Lymphknotenschwellung usw. begleitet werden kann (Bass *et al.*, 1997; Waldvogel *et al.*, 1994).

Immunsupprimierte Patienten (z.B. HIV-positive Patienten) können bei einer Infektion mit *B. henselae* an BA, BPH, Endokarditis, osteolytischen Läsionen sowie an generalisierten Infektionen erkranken (Köhler *et al.*, 1997). Bei BA und BPH handelt es sich um tumorartige Gefäßproliferationen, in denen der Erreger mikroskopisch, molekulargenetisch oder durch Anzucht nachweisbar ist und die sich durch Antibiotikabehandlung wieder völlig zurückbilden (Köhler *et al.*, 1992; LeBoit *et al.*, 1989). Bei der BA (kutane Form) treten einzelne oder multiple vaskuloproliferative Läsionen der Haut auf, die sich histologisch durch die Bildung von Knötchen und vaskulären Tumoren auszeichnen. Die Hautläsionen ähneln denen der Verruga Peruana, der chronischen Form der Carrion'schen Erkrankung. Betreffen diese Läsionen Knochenmark, Leber, Milz oder Lymphknoten spricht man von der bazillären Peliosis hepatis (BPH, parenchymale Form; (Köhler *et al.*, 1988; Marasco *et al.*, 1989; Milam *et al.*, 1990). Bei der BPH entstehen durch zystische Vasoproliferationen blutgefüllte Kavernen, aus denen sich der Erreger anzüchten lässt (Rolain *et al.*, 2004; Koehler and Tappero, 1993; Slater *et al.*, 1992).

Abb. 1: Kutane Form der BA bei einem HIV-Patienten.
(http://edcenter.med.cornell.edu/Pathphysiology_Cases/HIV/Cutaneous_Manifestations/4976.gif)

1.3. Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae*

Nur wenige Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* sind bislang charakterisiert **(Tab. 2)**. Als mögliche Pathogenitätsfaktoren wurden sogenannte „Pili" beschrieben, die phänotypisch Typ IV-Pili ähneln (Batterman *et al.*, 1995) und eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Invasion der Bakterien an Epithelzellen (Batterman *et al.*, 1995; Dehio *et al.*, 1997) und Endothelzellen spielen (Kempf *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die sogenannten ,,Pili'' eine entscheidende Bedeutung bei der Induktion der *vascular endothelial growth factor*- (VEGF) Sekretion durch die Wirtszelle haben (Kempf *et al.*, 2001). Häufiges Passagieren der Bakterien auf Agarplatten führt elektronenmikroskopisch sichtbar zum Verlust der Pilusexpression (Kempf *et al.*, 2001; Batterman *et al.*, 1995). Vermutet wurde, dass diese Beobachtung durch Phasenvariation in der Pilusexpression erklärt werden kann (Batterman *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu wurde beschrieben, dass Phasenvariation mit den typischen phänotypischen Veränderungen auch ohne den Verlust der Pilusexpression einhergehen kann (Kyme *et al.*, 2003). Eigene Untersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben, dass es sich bei diesen sogenannten „Pili" nicht um Typ IV-Pili, sondern um das erst kürzlich entdeckte *Bartonella* Adhäsin A (BadA) handelt, das der Familie nicht-fimbriellen Adhäsine zugeordnet wird. BadA ist ein 340 kDa großes Protein, das von dem 9,3 kb großen *badA*-Gen kodiert wird. Es befindet sich auf der Außenmembran von *B. henselae* und hat homologe Domänen zu *Yersinia* Adhäsin A (YadA) von *Yersinia enterocolitica*. YadA gehört ebenfalls zur Familie der nicht-fimbriellen Adhäsine und vermittelt unter anderem die Adhärenz an Wirtszellen und Proteine der extrazellulären Matrix (EZM; Roggenkamp *et al.*, 1996; Schulze-Koops *et al.*, 1992). Die BadA-Expression schützt vor Phagozytose und vermittelt die Bindung von *B. henselae* an Proteine der EZM sowie an Endothelzellen. BadA spielt eine wichtige Rolle in der Wirtszelladhäsion, ist entscheidend für die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor-1 (HIF-1) und triggert die VEGF-Sekretion sowie die Sekretion weiterer proangiogenetischer Faktoren (Kempf *et al.*, 2001; Batterman *et al.*, 1995). Die Expression von BadA ist entscheidend für die Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort und ist somit vermutlich ein wichtiger Pathogenitätsfaktor in der Induktion der vaskuloproliferativen Erkrankungen BA und BPH (Riess *et al.*, 2004).

Weiterhin ist das Typ IV Sekretionssystem (T4SS) als Virulenzfaktor bei *B. henselae* bekannt. Prototyp für das Transportsystem ist das *virB*-D4 System von *Agrobacterium tumefaciens*, dem Erreger der sogenannten „Wurzelhalsgalle". Das *virB*-System ist hier für den Transport der Transfer-DNA in die Pflanzenzelle verantwortlich. Durch T4SS werden

bakterielle Effektormoleküle (DNA-, DNA-Proteinkomplexe oder Proteine) während der Wirtszellinteraktion in die Wirtszelle transloziert (Cascales and Christie, 2003). Humane Pathogene haben das Transportsystem adaptiert, um Toxine ins extrazelluläre Milieu (z.B. Pertussis-Toxin von *Bordetella pertussis*) oder direkt ins Wirtszellzytosol zu transportieren (z.B. CagA von *Helicobacter pylori;* Cascales and Christie, 2003). Das *virB*-T4SS spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenität von *B. henselae*. So ist das *virB*-System von *B. henselae* an der Inhibition der Apoptose, der NF-κB abhängigen proinflammatorischen Wirtszellantwort, der Invasom-Bildung und an Aktinrearrangements von Endothelzellen beteiligt (Schmid *et al.*, 2004; Padmalayam *et al.*, 2000). *Bartonella* spp. kodieren zwei verschiedene T4SS (*virB*-D4 T4SS und Trw-T4SS), deren Anwesenheit essentiell für die Initiierung einer Infektion im Tiermodell ist (Schulein and Dehio, 2002; Seubert *et al.*, 2003). Das *virB*-D4-T4SS von *B. henselae*, *B. tribocorum* und *B. quintana* zeigt Homologie zu *virB*-D4 von *A. tumefaciens* (Schmiederer and Anderson, 2000; Padmalayam *et al.*, 2000; Schulein and Dehio, 2002). Es vermittelt während der frühen Infektionsphase die Interaktion mit Endothelzellen im Säugerreservoir oder im humanen Fehlwirt (Schulein and Dehio, 2002; Dehio, 2003). Kürzlich konnten sieben durch das *virB*-System transportierte *Bartonella*-translozierte Effektorproteine (Bep A-G) als Pathogenitätsfaktoren identifizert werden, die zusammen mit dem *virB*-System und dem T4SS-Bindeprotein *virD4* auf einer *Bartonella*-spezifischen Pathogenitätsinsel kodiert werden. Für diese Beps wurde gezeigt, dass sie in der Wirtszelle die *virB*-abhängigen, zellulären Veränderungen wie Rearrangements des Zytoskellets, Inflammation und Hemmung der Apoptose vermitteln (Schulein *et al.*, 2005).

In der Pathogenität vieler Bakterien spielen ebenfalls Oberflächenproteine eine wichtige Rolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass Außenmembranproteine (OMPs; Burgess and Anderson, 1998; Fuhrmann *et al.*, 2001) die Adhärenz von *B. henselae* an Endothelzellen und Endothelzell-Proliferation vermitteln und die proinflammatorische Endothel-Zellantwort durch Aktivierung von NF-κB und der nachfolgenden Geninduktion von ICAM-1 und E-Selektin induzieren (Burgess and Anderson, 1998; Fuhrmann *et al.*, 2001; Conley *et al.*, 1994).

Ebenfalls bekannt ist, dass die Expression vieler bakterieller Pathogenitätsfaktoren Fe^{2+}-reguliert ist. Die Eisenaufnahme wird hierbei über das *ferric uptake regulation* Protein (Fur) gesteuert, das ebenfalls in *B. henselae* identifiziert werden konnte (Park *et al.*, 2001). Für *B. henselae* konnte weiterhin ein Hämin-abhängiges Wachstumsverhalten nachgewiesen werden (Sander et al., 2000). In diesem Zusammenhang wurde ein ursprünglich als Phagen-

assoziiertes charakterisiertes Protein (Pap31) von *B. henselae* als ein Hämin-bindendes Protein identifiziert (Zimmermann *et al.*, 2003). Allerdings ist die Rolle von Fur und Pap31 in der *B. henselae*-Pathogenität bisher noch nicht untersucht worden.

Als weiterer vermuteter Pathogenitätsfaktor von *B. henselae* wurde Deformin beschrieben. Es handelt sich um ein kleines hydrophobes Molekül mit hoher Affinität für Albumin (Derrick and Ihler, 2001), das von *B. bacilliformis* und *B. henselae* sekretiert wird (Iwaki-Egawa and Ihler, 1997). Dieses bakterielle Molekül triggert die Bildung von tiefen Gräben und Vertiefungen in der Erythrozytenmembran und ermöglicht somit den Eintritt der Bakterien in die Erythrozyten (Benson *et al.*, 1986).

Lipopolysaccharide (LPS) von *B. henselae* wurden kürzlich ebenfalls als mögliche Pathogenitätsfaktoren beschrieben. Das Bakterium interagiert mit Endotoxin-sensitiven Endothelzellen, ohne dabei einen septischen Schock aufgrund der Bakteriämie auszulösen. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass das *B. henselae*-LPS eine reduzierte endotoxische Aktivität besitzt (Matera *et al.*, 2003). Vergleicht man die endotoxische Aktivität von enterobakteriellem LPS (*Escherichia coli, Salmonella enterica*) mit dem von aufgereinigtem *B. henselae*-LPS, ist zu beobachten, dass das *B. henselae*-LPS eine 1000 bis 10 000 mal schwächere endotoxische Aktivität besitzt (Zähringer *et al.*, 2004).

Tab. 2: Übersicht über bekannte und vermutete Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae.*

Bezeichnung	**Charakterisierung**	**Funktion in der Infektion von Wirtszellen**	**Quelle**
BadA	repräsentiert Typ IV-Pilus, Außenmembranprotein, nicht-fimbrielles Adhäsin	Adhärenz an Endothelzellen, Adhärenz an extrazelluläre Matrixproteine, Aktivierung von HIF-1 und VEGF-Sekretion	(Riess *et al.*, 2004)
T4SS	*virB*-Operon (*virB2-10*)	Inhibition der Apoptose, NF-κB abhängige pro-inflammatorische Wirtszellantwort, Invasom-Bildung und Aktin-rearrangements	(Schmid *et al.*, 2004; Padmalayam *et al.*, 2000)
Bep A-G	*Bartonella*-translozierte Effektorproteine, durch *virB*-T4SS sekretiert	vermitteln in der Wirtszelle die *virB*-abhängigen zellulären Veränderungen wie Rearrangements des Zytoskellets, Inflammation, Apoptose und Proliferation	(Schulein *et al.*, 2005)

OMPs	23-92 kDa äußere Membranproteine	NF-κB abhängige, pro-inflammatorische Wirtszellantwort	(Fuhrmann *et al.*, 2001)
OMP43	43 kDa äußeres Membranprotein	Adhärenz an Endothelzellen	(Burgess and Anderson, 1998)
Fur	eisenabhängiger Genregulator	unbekannt, Einfluss auf transkriptionelle Regulation von Pathogenitätsfaktoren?	(Park *et al.*, 2001)
Pap31	Hämin-Bindeprotein	unbekannt, bakterielle Replikation in Wirtszellen?	(Zimmermann *et al.*, 2003)
Deformin	hydrophobes Molekül mit Affinität für Albumin	vermittelt Eintritt der Bakterien in die Erythrozyten	(Derrick and Ihler, 2001; Benson *et al.*, 1986)
LPS	kurzkettiges Lipopolysaccharid	besitzt verminderte endotoxische Aktivität	(Zähringer *et al.*, 2004; Matera *et al.*, 2003)

1.4. Angiogenese

1.4.1. Physiologische Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Neubildung von Blutgefäßen (i) durch Aussprossung aus schon vorhandenen Blutgefäßen, die durch wandständige Zellen stabilisiert werden oder (ii) durch Intussuszeption, bei der ein Gefäß durch Ausbildung transkapillarer Säulen, sowie durch Einstülpung umgebender Perizyten und extrazellulärer Matrix in zwei neue Gefäße aufgeteilt wird (Carmeliet, 2003). Dieses Gefäßwachstum kann durch die Freisetzung angiogenetischer Wachstumsfaktoren, sowie durch endotheliale Progenitorzellen (EPCs) gefördert werden (Rehman *et al.*, 2003). Das ausgedehnte Wachstum präexistierender Gefäße ist gekennzeichnet durch kollaterales Wachstum sowie durch Ausbildung kollateraler Brücken zwischen dem arteriellen Netzwerk. Beim Erwachsenen findet diese physiologische Angiogenese jedoch nur noch in Wundheilungsprozessen sowie beim Aufbau der Uterusschleimhaut statt (Ferrara, 2000; Folkman, 1995).

Von der Angiogenese ist die Vaskulogenese zu unterscheiden, bei der es sich um Bildung primärer Blutgefäße während der Embryonalentwicklung aus endothelialen Progenitorzellen (EPCs) handelt (Risau, 1997). Diese differenzieren in arterielle und venöse Endothelzellen und bilden zunächst ein primitives vaskuläres Labyrinth aus, das in ein komplexeres Netzwerk aus voneinander abgegrenzten Arterien und Venen umgebildet wird (Carmeliet, 2003).

1.4.2. Pathologische Angiogenese

Pathologische Formen der Angiogenese findet man bei Krebserkrankungen (Folkman *et al.*, 1971), inflammatorischen Erkrankungen (Psoriasis, Arthritis, Asthma, Artheriosklerose) sowie bei viralen Infektionserkrankungen (Carmeliet, 2003; Carmeliet and Jain, 2000). Unter den bakteriellen Pathogenen ist nur aus der Familie der *Bartonellaceae* (*B. bacilliformis*, *B. henselae* und *B. quintana*) bekannt, vaskuloproliferative Erkrankungen wie BA und BPH zu induzieren (Garcia *et al.*, 1990; Köhler *et al.*, 1997; Maurin and Raoult, 1996).
Angiogenese spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung solider Tumore, da diese ohne Blutgefäße nicht unbegrenzt weiterwachsen und in andere Organe metastasieren können (Carmeliet and Jain, 2000). Neu gebildete Kapillaren verbessern die Nährstoffversorgung des Tumors und gewährleisten damit dessen weiteres Wachstum und Metastasierung (Folkman, 1971).
Ein Beispiel für infektiöse Angiogenese ist das Humane Herpesvirus-8 (HHV-8), das bei AIDS-Patienten die Entstehung eines vaskulären Tumors (Kaposi-Sarkom) verursacht (Chang *et al.*, 1994). Beim Kaposi-Sarkom handelt es sich um den häufigsten vaskulären Tumor bei HIV-infizierten Patienten (Scadden, 2003). Eines der angiogenetischen Gene, das durch ORF 74 kodiert wird, stellt einen konstitutiv aktiven CXC Chemokin G Proteingekoppelten Rezeptor (GPCR) dar, der eine starke Homologie zu einem CXCR2 Rezeptor zeigt, an welchen das humane angiogenetisch wirksame Chemokin Interleukin-8 (IL-8) bindet (Sodhi *et al.*, 2000; Arvanitakis *et al.*, 1997; Burger *et al.*, 1999). Dieser Rezeptor besitzt angiogenetisches Potential und seine Stimulation bewirkt, die VEGF-Sekretion in GPCR-exprimierenden KSHV-Zellen auszulösen (Bais *et al.*, 1998). Das Virus infiziert sowohl Endothel- als auch Epithelzellen (Bechtel *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2001) und induziert Angiogenese durch Zellproliferation über p44/p42- und p38-MAPK-Signalkaskaden (Smit *et al.*, 2002; Naranatt *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 1993) sowie über VEGF-Sekretion und vorausgegangene Aktivierung des Transkriptionfaktors HIF-1, der über die p38-MAPK-Signalkaskade aktiviert wird (Sodhi *et al.*, 2000; Smit *et al.*, 2002).

Auf der anderen Seite hätte die Stimulation der Angiogenese eine hohe therapeutische Potenz, wie z.B. in ischämischen Erkrankungen. Durch Stimulierung der Angiogenese könnte hierbei die Durchblutung des betroffen Gewebes (z. B. ischämische Herzerkrankungen) und damit dessen Nährstoffversorgung verbessert werden (Lei *et al.*, 2004).

1.5. Der Transkriptionsfaktor „*hypoxia inducible factor*-1 (HIF-1)“

Hypoxie trägt entscheidend zur Angiogenese bei (Carmeliet and Jain, 2000) und aktiviert Hypoxie-induzierbare Transkriptionsfaktoren (HIFs), die ihrerseits die Expression verschiedener angiogenetischer Faktoren induzieren (Semenza, 1998). HIF-1 ist ein sauerstoffregulierter Transkriptionsfaktor, der in den meisten kernhaltigen Zellen als Antwort auf Hypoxie induziert wird und eine wichtige Rolle in der Angiogenese und der Adaption von Zellen, Geweben und Organismen an Hypoxie spielt (Semenza, 2001b). Der Transkriptionsfaktor induziert die Transkription von Genen, die:

(i) an der Entstehung und Entwicklung des vaskulären Systems beteiligt sind [VEGF, *platelet-derived growth factor* (PDGF), *placental growth factor* (PlGF), Endothelin-2 sowie Mitglieder der Ephrin-Familie],

(ii) in Zellproliferation sowie in Apoptose involviert sind [z.B. Adrenomedullin, *Insulin-like growth factor binding protein-3* (IGFBP-3), *transforming growth factor*-β (TGF-β) und VEGF],

(iii) eine Rolle im Energiemetabolismus spielen (z.B. Hexokinase 2, das in der Aufnahme und Nutzung von Glukose eine Rolle spielt; Yasuda *et al.*, 2004; Mathupala *et al.*, 2001),

(iv) in Erythropoese involviert sind (Erythropoetin: erhöht die Kapazität von systemischem Sauerstofftransport; Semenza, 2000a; Semenza, 2001a; Wenger, 2000)

(v) und die in Eisentransport involviert sind wie z.B. Transferrin (Maxwell and Salnikow, 2004; Semenza, 2001a).

In **Tab. 3** sind einige angiogenetisch wirksame Faktoren aufgelistet.

Tab. 3: Angiogenetisch wirksame Wachstumsfaktoren.

Gen	Funktion	Quelle
Adrenomedullin	Rolle in Tumorangiogenese, Gefäßentwicklung, Angiogenese der weiblichen Fortpflanzungsorgane, antiapoptotische Eigenschaften auf vaskuläre Endothelzellen, antiproliferative Eigenschaften auf glatte Muskelzellen, vasodilatorische Effekte	(Kitamura *et al.*, 1993; Kano *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1997; Caron and Smithies, 2001; Öhler *et al.*, 2002)
Angiopoietin-1/ -2	Entwicklung des vaskulären Endothels, Umbildung und Ausreifung des unreifen Gefäßsystems, Aufrecht-erhaltung von Quieszenz und Stabilität des ausgereiften Gefäßsystems	(Yancopoulos *et al.*, 2000)
Ephrin A1	Entwicklung des vaskulären Endothels, Umbildung und Ausreifung des unreifen Gefäßsystems, Regulation der Entwicklung zu arteriellen und venösen Gefäßen, Rolle in Tumorentstehung und Umbildung von Tumorgefäßen, proangiogenetische Wirkung	(Yancopoulos *et al.*, 2000; Ogawa *et al.*, 2000; Kataoka *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2002)
Endothelin-2	Rolle in Angiogenese, Inflammation, Tumorinvasion, Tumorprogression, Metastasierung, Beeinflussung von Vasokonstriktion und Dillatation, Wachstumsregulierung verschiedener Zelltypen, Chemoattraktant für Neutrophile	(Battistini *et al.*, 1993; Elferink and de Koster, 1996; Kedzierski and Yanagisawa, 2001; Grimshaw *et al.*, 2004; Salani *et al.*, 2000)
IGFBP-3	Rolle in Angiogenese, Induktion von Apoptose, Modulation der Aktivität von IGFs (*insulin-like growth factors*), Hemmung von Zellwachstum	(Ricort and Binoux, 2004; Schmid *et al.*, 2003)
IL-8	Rolle in der Angiogenese, chemotaktische Wirkung auf Neutrophile und Lymphozyten, proliferativer und chemotaktischer Stimulus auf HUVEC, Modulator des Immunsystems, NF-κB reguliert, Signalweg durch Hypoxie beeinflussbar	(Kampik *et al.*, 2000; Mukaida and Murayama, 1998; Strieter *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1992; Koong *et al.*, 1994)
Stanniocalzin-2	Regulation von Kalzium-, Phosphat- und Glukosehomeostase, Rolle als Wachstumsinhibitor, zytoprotektive Eigenschaften bei Zellstress, Förderung des Überlebens von Zellen, Rolle in Tumorerkrankungen	(Honda *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 1999; Gagliardi *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2003)
TGF-ß	Blutgefäßentwicklung	(Carmeliet, 2000)
VEGF (-A)	Entwicklung des vaskulären Endothels, Initiierung der Bildung unausgereifter Gefäße, angiogenetische Sprossung während der Entwicklung im Erwachsenen, Förderung der vaskulären Permeabilität und Proliferation vaskulärer Endothelzellen	(Ferrara, 1999; Dvorak *et al.*, 1999)

HIF-1 wird in einer Vielzahl von Erkrankungen aktiviert, die mit Gewebehypoxie (z.B. ischämische Erkrankungen, Tumore) assoziiert sind (Wenger, 2002; Metzen *et al.*, 2003). Z. B. wird in Tumorzellen die VEGF-Sekretion hochreguliert, während im Tumorendothel vermehrt VEGF-Rezeptoren exprimiert werden. Daraus folgt, dass von Tumoren freigesetztes VEGF das Einwachsen von Kapillaren sowie die Proliferation des Tumorendothels in parakriner Art und Weise stimuliert (Breier *et al.*, 1997).

HIF-1 gehört zur Familie der *basic helix-loop-helix-Per/ARNT/Sim* (PAS)-Proteine (Wang *et al.*, 1995) und bildet ein Heterodimer aus einer HIF-1α- und einer HIF-1β-Untereinheit. HIF-1β ist auch unter dem Namen *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) bekannt. Weiterhin zählen HIF-2α (Ema *et al.*, 1997; Hogenesch *et al.*, 1997) und HIF-3α (Gu *et al.*, 1998) zu dieser Familie. Die Untereinheiten zeichnen sich durch teilweise überlappende Expressionsmuster *in vitro* und *in vivo* aus (Wiesener *et al.*, 1998; Talks *et al.*, 2000; Kietzmann *et al.*, 2001) und können mit der Bindungsstelle von HIF-1-Zielgenen interagieren (Wenger, 2002).

HIF-1α wird für das Überleben mesenchymaler Zellen während der Entwicklung benötigt, da in Mausexperimenten gezeigt werden konnte, dass HIF-1α-Knockout-Mausembryonen an kardiovaskulären Missbildungen und Neuralrohrdefekten starben (Kotch *et al.*, 1999). Dass HIF-1 in der Entwicklung und Physiologie eine wichtige Rolle spielt, konnte ebenfalls anhand embryonaler Maus-Stammzellen gezeigt werden, in denen das HIF-1α-Allel homozygot oder heterozygot außer Funktion gesetzt wurde. Stammzellen mit homozygot bzw. heterozygot funktionslosem HIF-1α-Allel, zeigten einen totalen bzw. partiellen Verlust der HIF-1α-Expression und DNA-Bindungsaktivität. Weiterhin konnte eine deutliche Abnahme der Genexpression von Glukosetransportern, glykolytischen Enzymen und VEGF gezeigt werden (Iyer *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998). HIF-2α-Knockout-Mausembryonen starben aufgrund von Bradykardien (Tian *et al.*, 1998), was auf eine wichtige Rolle von HIF-2 in der Umbildung des primären vaskulären Netzwerkes schließen lässt (Peng *et al.*, 2000).

Die Transkriptionsfaktoren HIF-1α und HIF-2α bieten damit Schutz vor schwerer und anhaltender Hypoxie, während HIF-3α eine Rolle in der frühen Phase der Adaption an geringen Sauerstoffgehalt spielt und Schutz gegen moderate Hypoxie bietet (Heidbreder *et al.*, 2003).

1.6. Regulation von HIF-1

Die α- und β-Untereinheiten des Transkriptionsfaktors HIF-1 werden konstitutiv exprimiert. Während ARNT jedoch unter Normoxie in konstanter Konzentration in der Zelle vorliegt, wird die HIF-1α-Untereinheit unter Normoxie mit einer Halbwertszeit von weniger als 5 min durch Ubiquitinylierung und proteosomaler Degradierung abgebaut (Kallio *et al.*, 1999; Sutter *et al.*, 2000). Die Degradierung wird über das „von Hippel-Lindau“ Tumor Supressor Protein (pVHL) vermittelt, das Teil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist, das seinerseits an hydroxylierte HIF-1α-ODD-Domänen (sauerstoff-abhängige Degradierungs-Domäne) bindet, die sich in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) befinden (Jaakkola *et al.*, 2001; Ivan *et al.*, 2001).
Die schnelle Proteolyse der HIF-1α-Untereinheit in oxygenierten Zellen wird durch drei erst kürzlich beschriebene homologe HIF-Prolylhydroxylasen (PHD1, -2, -3) vermittelt, die als Sauerstoffsensoren identifiziert wurden (Jewell *et al.*, 2001; Bruick and McKnight, 2001; Epstein *et al.*, 2001) und die die Sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne (ODD) der HIF-1α-Untereinheit durch Hydroxylierung von zwei Prolinresten (Pro402 und Pro564) modifizieren (Jaakkola *et al.*, 2001; Ivan *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1998). PHDs gehören zur Familie der Dioxygenasen, die Sauerstoff, 2-Oxoglutarat und Askorbat als Kosubstrat benötigen. Kürzlich wurde gezeigt, dass die drei Propylhydroxylasen in der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind (Metzen *et al.*, 2003). Alle drei PHDs reduzieren die Expression von HIF-1α unter Normoxie, können aber auch unter Hypoxie die Induktion von endogenem HIF-1α aufheben, um übermäßige Akkumulation von nukleärem HIF-1α zu vermeiden.
PHD1 kommt ausschließlich im Zellkern vor, kann durch Östrogene induziert werden und wirkt stimulierend auf die Zellproliferation. Die Hauptaufgabe des Enzyms scheint jedoch nicht die Regulierung von HIF-1α zu sein (Seth *et al.*, 2002). PHD2 kommt hauptsächlich im Zytoplasma vor, während PHD3 im Zytoplasma und im Nukleus nachweisbar ist (Metzen *et al.*, 2003). PHD2 scheint der Hauptsauerstoffsensor der drei PHDs zu sein (Berra *et al.*, 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in Zellen, die hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, PHD-2- und PHD-3-, nicht jedoch PHD-1-mRNA, hochreguliert wird (Epstein *et al.*, 2001; Metzen *et al.*, 2003). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass die PHD-2- und PHD-3-mRNA-Expression ihrerseits durch HIF-1α sowie HIF-2α reguliert wird, was einen negativen Feedback-Mechanismus darzustellen scheint (Aprelikova *et al.*, 2004).

PHDs enthalten als Kofaktor Eisen, das über zwei Histidin- und ein Aspartatsäurerest gebunden ist. Unter Normoxiebedingungen wird ein Sauerstoffatom auf den Prolinrest der HIF-1α-Untereinheit transferiert, während das zweite Sauerstoffatom mit dem 2-Oxoglutarat reagiert. Als Endprodukte entstehen bei dieser Reaktion Succinat und CO_2. Bei Sauerstoffentzug oder Inaktivierung der PHDs durch Substratanaloge (Eisenchelatoren wie z.B. DFO, Oxidierung oder durch Austausch von Metallionen wie z.B. Kobalt, Nickel) bleiben die HIF-Prolinreste unmodifiziert und werden daher proteosomal degradiert (Wenger, 2002; Maxwell and Salnikow, 2004).

Eine weitere Möglichkeit, die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 zu regulieren, besteht in der Hydroxylierung von Asparaginresten (Asn803 und Asn851) in der C-terminalen TAD in HIF-1α- und HIF-2α-Untereinheiten durch die Asparaginylhydroxylase *factor inhibiting HIF-1* (FIH-1). FIH-1 ist hauptsächlich im Zytoplasma, jedoch auch zu einem geringen Anteil im Nukleus lokalisiert. Das Enzym interagiert mit HIF-1α und pVHL, ist jedoch nicht an der Degradierung von HIF-1α beteiligt, sondern inaktiviert die C-terminale Transaktivierungsdomäne von HIF-1α (Mahon *et al.*, 2001; Metzen *et al.*, 2003). Durch die Hydroxylierung der Asparaginreste wird der Rekrutierung und Interaktion mit dem Koaktivatorprotein CBP/p300 entgegengewirkt und somit in normoxischen Zellen die transkriptionelle Aktivität von HIF-α-Untereinheiten herabgesetzt (Lando *et al.*, 2002; Kallio *et al.*, 1998; Ebert and Bunn, 1998).

In hypoxischen Zellen kommt es durch posttranskriptionelle Stabilisierung der HIF-1α-Untereinheit zu einer Erhöhung des HIF-1α-Proteinlevels im Zytoplasma (Kallio *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1996). Die HIF-1α-Untereinheit wird aus dem Zytoplasma in den Nukleus transportiert und bildet ein Heterodimer mit der HIF-1β-Untereinheit. Der Transkriptionsfaktor bindet an *hypoxia responsive elements* (HREs), die Erkennungssequenz für HIF-1, die sich in den Promotorregionen von Hypoxieinduzierbaren Genen befinden (Semenza, 1998). Außerdem kommt es zu einer Aktivierung der C-terminalen Transaktivierungsdomäne, die zur Rekrutierung des CBP/p300 Koaktivators führt und die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 erhöht (Kallio *et al.*, 1998). Das wiederum führt zur verstärkten Aktivierung von Zielgenpromotoren (z.B. VEGF, Erythropoetin) unter Hypoxie (Arany *et al.,* 1996). Ebenfalls kann ein großes Spektrum an Wachstumsfaktoren wie z.B. Insulin, *insulin-like growth factors* und *epidermal growth factors* (IGF, EGF; (Maxwell *et al.*, 2001; Semenza, 2000c), durch Induktion der *Ras superfamily of small guanosin triphosphatases (GTPases)*/*Ras-regulated serine/threonine protein kinase* - *mitogen-activated ERK-activating kinase* - *extracellular signal-regulated kinase*-1/-2 (Ras/Raf-MEK-

ERK1/ERK2; Richard *et al.*, 1999; Conrad *et al.*, 1999; Berra *et al.*, 2000), sowie der *Phosphatidylinositol 3'-kinase - phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 - protein kinase B*-Signalkaskaden (PI3-kinase/PTEN/Akt; Chen *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000) zur Stabilisierung und Regulierung der transkriptionellen Aktivität von HIF-1α beitragen **(**siehe **Abb. 2)**.

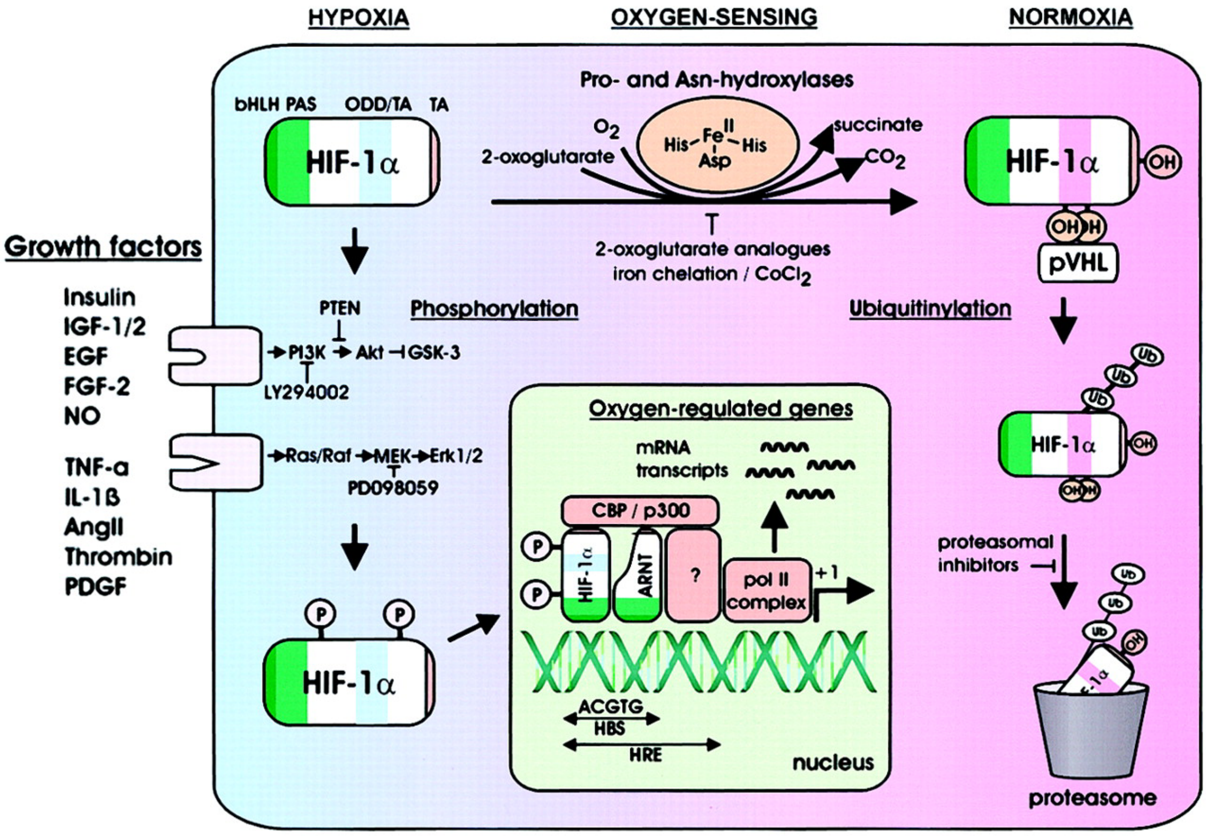


Abb. 2: Regulation der Aktivierung bzw. Degradation von HIF-1α während normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen (Wenger, 2002).

1.7. Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor-κB* (NF-κB)

Der Transkriptionsfaktor NF-κB kann Homo- bzw. Heterodimere aus Mitgliedern der NF-κB/Rel Familie bilden. Zu dieser Familie zählen RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p50) und NF-κB2 (p52) (Ghosh *et al.*, 1998). Das am häufigsten vorkommende Heterodimer besteht aus einer p65/p50-Untereinheit und kommt in inaktiver Form, ein Heterotrimer mit IκBα bildend, im Zytoplasma vor (Aggarwal, 2004). Die inaktive Form ist mit regulatorischen Proteinen assoziiert (IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBαε, bcl-3, p105, p100), sogenannten Inhibitoren von κB (IκB), die die Bindung an die Kernlokalisierungssequenz verhindern. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors kann durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Stimuli erfolgen,

wie z.B. durch Zytokine (TNF, IL-1), bakterielle Lipopolysaccharide, ultraviolette Strahlung und Wasserstoffperoxid (Li and Verma, 2002) und wird durch eine signalinduzierte proteolytische Degradierung von IκB im Zytoplasma gesteuert. IκB wird an zwei Serinresten der IκBα-Untereinheit (Ser32, Ser34) phosphoryliert. Die Phosphorylierung wird durch IκB-Kinasen (IKK) vermittelt, die aus zwei verschiedenen katalytischen Untereinheiten (IKKα, IKKβ), auch Signalosom genannt, bestehen. Je zwei dieser IKKα/IKKβ-Dimere werden durch eine regulatorische Untereinheit (IKKγ) zusammengehalten (Israel, 2000; Rothwarf *et al.*, 1998; Miller and Zandi, 2001). Phosphoryliertes IκB wird durch eine E3-Ubiquitin-Ligase ubiquitinyliert. Die Degradierung erfolgt analog zu HIF-1α durch das 26S-Proteasom. Als Folge dessen wird die Kernlokalisierungssequenz von NF-κB freigegeben, kann mit der nukleären Importmaschinerie interagieren und wird in den Nukleus transloziert. Dort bindet der Transkriptionsfaktor an den Promotor zahlreicher Zielgene und initiiert deren Transkription (Ghosh and Karin, 2002; Pahl, 1999; Karin and Ben-Neriah, 2000). Diese Gene sind an einer Vielzahl von Vorgängen wie Angiogenese, Apoptose, Inflammation, Onkogenese und Proliferation beteiligt (Aggarwal, 2004). Interessant ist im Bereich der Onkologie die antiapoptotische Wirkung von NF-κB, sowie die Induktion des proinflammatorischen als auch proangiogenetischen Zytokins IL-8 (Koch *et al.*, 1992).

1.8. Interaktion von *Bartonella henselae* mit Endothelzellen

B. henseale ist als Verursacher der KKK sowie tumorartiger Gefäßproliferationen wie der BA und BPH bekannt, aus denen das Bakterium nachweisbar und isolierbar ist (Rolain *et al.*, 2004; Maurin *et al.*, 1997; Köhler *et al.*, 1997; Köhler *et al.*, 1992). In histologischen Untersuchungen von BPH- und BA-Biopsaten konnte der direkte Kontakt von Bartonellen mit proliferierenden Endothelzellen nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass *Bartonellae* Endothelzellproliferation, Migration und Angiogenese induzieren (Chan *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 1993; Conley *et al.*, 1994). Diese Tatsachen sprechen für eine Rolle des Endothels als Zielgewebe für intra- und extrazelluläre Kolonisierung durch Bartonellen (Manders, 1996).

Endothelzellen spielen eine zentrale Rolle in der Angiogenese. Sie kleiden Gefäße aus und durchlaufen während der Angiogenese kaskadenartig die Phasen der Migration, Proliferation und Differenzierung (Carmeliet, 2003; Folkman, 1984). Um die vaskuloproliferative Interaktion zwischen *B. henselae* und humanem vaskulären Endothel zu untersuchen, wurden

bisher Endothelzellen (HUVEC) als *in vitro*-Modell verwendet, da bislang noch kein geeignetes Tiermodell zur BA vorhanden ist.

Bisher sind zwei verschiedene Invasionsmechanismen für *Bartonella* beschrieben worden. Im Fall der klassischen Invasion, die sich innerhalb von Stunden ereignet, adhärieren Bartonellen an Endothelzellen und dringen durch einen aktinabhängigen Prozess, innerhalb von membrangebundenen Kompartimenten, den perinukleären Vakuolen, in die Endothelzelle ein (Zbinden *et al.*, 1995). Weiterhin wurde ein langsam ablaufender „Invasom"-vermittelter Mechanismus beschrieben, der ca. 24 h dauert und spezifische Wirtszell-Pathogen-Interaktionen erfordert. Beim Invasom handelt es sich um eine solitäre, globuläre Struktur mit einem Durchmesser von 5-15 µm, die sich distal vom Zell-Nukleus befindet. Der Invasionsprozess beginnt mit der Akkumulation und Aggregatbildung der Bakterien an der Zelloberfläche. Danach erfolgt die Internalisation der bakteriellen Aggregate durch das Invasom (Dehio *et al.*, 1997).

Eine *B. henselae*-Infektion führt zu einer Außenmembranprotein (OMP)-vermittelten Aktivierung und Proliferation von Endothelzellen, während bakterielles LPS nur einen geringen Effekt auf die Endothelzellaktivierung auszuüben scheint (Fuhrmann *et al.*, 2001). Das Resultat der Endothelzellaktivierung ist die Initiation eines proinflammatorischen Phänotyps. Während der Initiation der proinflammatorischen Antwort kommt es zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, der die Transkription von Adhäsionsmolekühlen (ICAM-1, E-Selektin) reguliert, die ihrerseits einen frühen Schritt der Inflammation, die Abrundung und nachfolgende Adhäsion zirkulierender polymorphonukleärer Leukozyten (PMN) an das Endothel, aktivieren (Fuhrmann *et al.*, 2001). Des weiteren induziert NF-κB die Sekretion endogener Wachstumsfaktoren wie z.B. IL-8 (Kempf *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 1992) sowie die Chemokinsekretion wie z.B. IL-6, IL-1β und TNF-α (Ono *et al.*, 1999; Sunderkotter *et al.*, 1994).

In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass sich die Kokultivierung von *B. henselae* mit viablen Endothelzellen auf das bakterielle Wachstumsverhalten auswirkt. Der Vergleich *B. henselae*-infizierter Endothelzellen mit auf Agarplatten kultivierten *B. henselae* ergab eine gesteigerte Synthese an bakterieller ribosomaler (r) -RNA und einen erhöhten Ribosomengehalt in kokultivierten Bakterien, die mit einer verstärkten Replikation von *B. henselae* korreliert (Kempf *et al.*, 2000). Weiterhin kann *B. henselae* indirekt die Proliferation von Endothelzellen über Effektorzellen fördern. Infektionsversuche von Ea.hy 926-Zellen (Fusion aus HUVEC und einer Lungenkarzinomzelllinie A549) mit *B. henselae* führten zu einer Sekretion von VEGF in den Zellkulturüberstand (Kempf *et al.*, 2001). VEGF, das einen

starken spezifischen Proliferationsfaktor für Endothelzellen darstellt (Leung *et al.*, 1989), spielt bekannterweise eine wichtige Rolle in der Angiogenese (Yancopoulos *et al.*, 2000). Wurde im Anschluss an die Infektion dieser Zellen das konditionierte Medium zu Endothelzellen (HUVEC) gegeben, führte dies zu einer verstärkten Proliferation der HUVECs, was seinerseits das Wachstum von *B. henselae* förderte (Kempf *et al.*, 2001). VEGF schien jedoch nicht der einzige an der Proliferation beteiligte Wachstumsfaktor zu sein, da die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern die Proliferation der HUVEC nur um etwa 50% senkte (Kempf *et al.*, 2001).

Auch von monozytären Zellen ist bekannt, nach Aktivierung angiogenetische Faktoren zu produzieren. Zudem konnten Makrophagen in humaner Tumorangiogenese nachgewiesen und die Infiltration von BA-Läsionen durch Makrophagen gezeigt werden (Ono *et al.*, 1999; LeBoit *et al.*, 1989; Monteil *et al.*, 1994). Von Makrophagen (THP-1), die mit *B. henselae* infiziert wurden, ist ebenfalls die Sekretion bekannter Mediatoren der Angiogenese beschrieben worden, wie z.B. die von VEGF und IL-1β (Resto-Ruiz *et al.*, 2002). Ähnlich wie für konditioniertes Medium infizierter Ea.hy 926-Zellen beschrieben (Kempf *et al.*, 2001), induzierte konditioniertes Medium der Makrophagen ebenfalls die Proliferation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1; Resto-Ruiz *et al.*, 2002). Aus der Beobachtung, dass *B. henselae*-infizierte Effektorzellen, wie z.B. Makrophagen (Resto-Ruiz *et al.*, 2002) oder Ea.hy 926-Zellen (Kempf *et al.*, 2001), eine gesteigerte Sekretion angiogenetischer Wachstumsfaktoren aufweisen, die ihrerseits eine verstärkte Proliferation der Endothelzellen bedingen, entstand das *paracrine loop*-Modell. Dieses Modell beschreibt die Induktion der Endothelzellproliferation durch *B. henselae* anhand von Wachstumsfaktoren wie VEGF und IL-8 als neuartige Pathogenitätsstrategie von *B. henselae* (Kempf *et al.*, 2002). Das *paracrine loop*-Modell orientiert sich dabei am Pathomechanismus von *Agrobacterium tumefaciens*, das die sogenannte „Wurzelhalsgalle“, einen vaskulären Pflanzentumor, hervorruft. Nach einer T4SS-abhängigen Translokation der Transfer (T) -DNA inseriert diese stabil ins Pflanzengenom und kodiert für Faktoren, die das Wachstum der Pflanzenzellen anregen (Auxine, Cytokinine) und den Erreger mit Nährstoffen (Opinen) versorgen, der sich somit ein geeignetes Habitat schafft. *B. henselae*, das phylogenetisch eng verwandt mit *A. tumefaciens* ist, verfügt über ein homologes T4SS (Padmalayam *et al.*, 2000; Schmiederer and Anderson, 2000) und schafft sich demnach vermutlich ähnlich einen geeigneten Lebensraum. Dabei induziert *B. henselae* nach Infektion die Sekretion angioproliferativer Substanzen durch nicht-endotheliale Effektorzellen, wie Ea-hy 926, HeLa bzw. THP-1. Interessant hierbei ist, dass *Bartonella* spp. vornehmlich vaskuläres Gewebe kolonisiert (Dehio, 2001), im Gegensatz

dazu aber nur eine geringe Adhärenz an Epithelzellen [(Kempf *et al.*, 2005a) und unveröffentlichte Daten] zu beobachten ist. Die Sekretion angioproliferativer Substanzen durch die Effektorzellen stimuliert ihrerseits die Proliferation der Endothelzellen, wodurch sich der Erreger einen geeigneten Lebensraum (Endothelzelle) für Replikation und Wachstum schafft (Kempf *et al.*, 2002).

Ein weiterer Mechanismus von *B. henselae*, der in der Induktion vaskuloproliferativer Erkrankungen von BA und BPH eine Rolle spielt, stellt die Hemmung der Wirtszellapoptose dar. Für *B. henselae* konnte anhand von Infektionsversuchen eine antiapoptotische Wirkung auf Endothelzellen nachgewiesen werden, die zu einer verstärkten Proliferation von Endothelzellen führte (Kirby and Nekorchuk, 2002). Kürzlich konnte für Monozyten (Mono Mac 6) gezeigt werden, dass eine Infektion durch *B. henselae* zu einer Apoptose-Inhibition führte. Die Inhibierung wurde hierbei durch eine Inaktivierung der Caspase-3-Aktivität hervorgerufen (Kempf *et al.*, 2005b). Weiterhin resultierte eine *B. henselae*-Infektion in einer Aktivierung von NF-κB, das eine Schlüsselrolle in der Apoptose (Karin and Lin, 2002) und in einer Induktion NF-κB-regulierter antiapoptotischer Proteine (cIAP-1, -2; Chu *et al.*, 1997; Stehlik *et al.*, 1998) spielt, die bekanntermaßen aktive Caspase-3 und Caspase-7 inhibieren (LaCasse *et al.*, 1998; Kempf *et al.*, 2005b).

Daten von *B. henselae* belegen außerdem, dass ein direkter Kontakt für die antiapoptotische Aktivität nicht notwendig ist, da konditionierte Zellkulturüberstände ebenfalls in der Lage waren, Apoptose zu verhindern. Allerdings ist der antiapoptotische Faktor noch nicht bekannt (Kirby and Nekorchuk, 2002). Kürzlich wurde berichtet, dass das *virB*-T4SS von *B. henselae* für die Inhibition der Endothelzellapoptose entscheidend ist, da eine *in-frame*-Deletion in einem *virB*-Gen zu einem totalen Verlust der antiapoptotischen Eigenschaft führte (Schmid *et al.*, 2004). Somit spricht die proliferative und antiapoptotische Eigenschaft von *B. henselae* für ein neues Pathogenitätsmodell, durch das sich *B. henselae* ein geeignetes Habitat und Wachstumsvorteile verschafft.

1.9. Zielsetzung dieser Arbeit

Da wahrscheinlich ein „angiogenetischer Cocktail“ an der *B. henselae*-induzierten Endothelzellproliferation beteiligt ist, wurden zuerst in einem Zellkulturmodell HeLa-Zellen mit *B. henselae* infiziert und mit der daraus gewonnenen cDNA Transkriptionsanalysen durchgeführt, die mit einer Kontrollgruppe nicht-infizierter HeLa-Zellen verglichen wurden. Der Vergleich dieser Transkriptionsprofile führte zu der Beobachtung von einer mehr als zweifachen Induktion eines bestimmten Genmusters von *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen (siehe Tab.15).

Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

1) Die Ergebnisse der Gen-Chip-Experimente von HeLa-Zellen anhand einiger exemplarischer Beispiele auf mRNA- sowie auf Proteinebene zu verifizieren.
2) Die Rolle der HIF-1-Aktivierung als Antwort auf eine *B. henselae*-Infektion zu demonstrieren.
3) Das Genexpressionsmuster von *B. henselae*-infizierten Endothelzellen (HUVEC), die das eigentliche Ziel einer *B. henselae*-Infektion darstellen, mittels Gen-Chip-Experimenten zu untersuchen und das Genexpressionsmuster mit dem der *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen zu vergleichen.
4) Die Ergebnisse der Gen-Chip-Experimente der HUVEC-Zellen anhand einiger exemplarischer Beispiele auf mRNA- sowie auf Proteinebene zu verifizieren.
5) Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der HIF-Familie in *B. henselae*-infizierten Endothelzellen zu überprüfen.
6) Die mRNA-Induktion der Prolylhydroxylasen-1, -2, -3 nach einer *B. henselae*-Infektion und deren Rolle in der HIF-1α-Aktivierung zu untersuchen.
7) Die Aktivierung der p38-MAPK nach einer *B. henselae*-Infektion zu untersuchen und zu überprüfen, ob für VEGF eine posttranskriptionelle Regulierung durch mRNA-Stabilisierung mittels aktivierter p38-MAPK zutrifft.
8) Die Auswirkung bakterieller Faktoren wie *B. henselae*-LPS und-BadA auf die Stabilisierung der HIF-1α-Untereinheit zu untersuchen.

9) Die Effekte der Infektion von Kontroll-Bakterien (*Y. enterocolitica*, *E. coli*, *L. pneumophila*) auf die VEGF-Geninduktion, -Proteinsekretion, HIF-1-Aktivierung und die Zellviabilität der Wirtszellen mit denen einer *B. henselae*-Infektion zu vergleichen.
10) Eine quantitative Real-Time-PCR für ein auf dem HeLa-Gen-Chip nach einer *B. henselae*-Infektion als induziert angezeigtes Gen (KIAA0742) zu etablieren.
11) Weitere *B. henselae*-Transposonmutanten auf die Induktion der VEGF-Sekretion in Wirtszellen zu untersuchen, um weitere bakterielle Kandidatengene, die eine Rolle in der VEGF-Expression spielen, zu identifizieren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sollten auf molekularer Ebene einen Beitrag dazu leisten, Mechanismen der Angiogenese in *Bartonella*-spezifischen Erkrankungen zu analysieren, um neue Konzepte in der Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort in bakteriellen Infektionen zu etablieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Anaerobierbeutel	Oxoid, Hampshire, GB
Anaerobiertöpfe	Merck, Darmstadt
Analysenwaage: BP610, PT1200	Sartorius, Göttingen
Brutschränke: BBD 6220	Heraeus, Hanau
ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
Eppendorfpipetten und Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Filmentwickler: Curix 60	AGFA, Leverkusen
Geldokumentation: Fluor-S Multi-Imager	Bio-Rad, München
Software: Quantity one	Bio-Rad, München
Biometra Ti5	Biometra, Göttingen
Software: BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Gelelektrophorese: Power Pac 200/300	Bio-Rad, München
Konfokales Laserscan-Mikroskop: Leica DM IRE 2	Leica, Bensheim
Software: Photoshop 6.0	Adobe Systems, Mountain View, CA, USA
Laborbrenner: Gasprofi 2, WLD-TEC	Wartewig, Göttingen
Mikroskope: Axiolab, Axiovert 25, Axiovert 200	Zeiss, Jena
Mikrowellenherd: Micromat	AEG, Frankfurt a.M.
Neubauer-Zählkammer	Superior, Lauda-Königshofen
PCR-Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer: Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pipetus standard	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Quarzküvetten (Photometer)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Reagenzglasschüttler REAX top	Heidolph, Schwabach
Röntgenfilme: KODAK x-omat AR Film	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen
Sonificator	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Tischinkubator, Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turrax T8	IKA-Werke, Staufen
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifugen: Multifuge 3 S-R, MiniSpin plus,	Heraeus, Hanau
Biofuge Stratos, Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Plastik- und Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen:

Brand, Wertheim; Eppendorf, Hamburg; Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg; Gilson, WI, USA; Greiner, Nürtingen; Millipore, Bedford; Nunc, Roskilde, DK; Sarstedt, Berlin; Schott Duran, Mainz; Packard BioScience, Meriden, USA; Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA; Sartorius, Göttingen; Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.3. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Ambion, Huntington, UK; Amersham Pharmacia, Freiburg; Biochrom, Berlin; BioMérieux, Marcy l'Etoile; BioRad, München; Boehringer, Mannheim; Dako, Hamburg; Gibco BRL, Karlsruhe; ICN Biomedicals, Eschwege; Invitrogen, Karlsruhe; MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Roche, Mannheim; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.4. Antibiotika

Antibiotika	**Firma**
Ampizillin	ICN Biomedicals, Eschwege
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptomyzin	Biochrom, Berlin
Penizillin	Biochrom, Berlin
Kanamyzin	Sigma, Taufkirchen
Kanamyzinplättchen, 30 µg	Oxoid, Hampshire, England

2.1.5. Rekombinante Zytokine und Antikörper

Rekombinante Zytokine	**Firma**
Rekombinantes humanes IL-8	Pharmingen, San Diego, USA
Rekombinantes humanes VEGF	R&D Systems, Wiesbaden
Primär-Antikörper	**Firma**
Anti-Aktin	Chemikon, Hofheim
Anti-Adrenomedullin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Cyclin G2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Ephrin A1	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Ephrin A1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Flt-1	ReliaTech, Braunschweig
Anti-Hexokinase 2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-HIF-1α	BD-Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-HIF-1α	Novus Biologicals, Littleton, USA
Anti-HIF-2α	BD-Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-cIAP-2	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-IL-8	BD-Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti- IL-8	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-KDR	ReliaTech, Braunschweig
Anti-NDRG1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-γPAK	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Phospho-p38 MAPK	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-p38 MAPK	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-Phospho-p44/42 MAPK	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-p44/42 MAPK	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-Stanniocalcin 2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-SAPK/JNK MAPK	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-Tie-2	R&D Systems, Wiesbaden

Anti-VEGF	R&D Systems, Wiesbaden
Sekundär-Antikörper	
Anti-Biotin, HRP-gekoppelt	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-Maus, HRP-gekoppelt	Dako, Hamburg
Anti-Hase, HRP-gekoppelt	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Anti-Ziege, HRP-gekoppelt	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.6. Oligonukleotide für quantitative Real-Time-PCR

Primer	**Zielgen**	**Sequenz [5'- 3'; forward (f), reverse (r)]**	**Quelle**
JMJD1 S, f	KIAA0742	TGT CAA CTA TTG AGC CAC ACA GAC A	diese Arbeit
JMJD1 A, r	KIAA0742	GCA CCC TGT TGG CAA TTC TTT	diese Arbeit
JMJD1 TM	KIAA0742	CGG TAG CAG TCC ACA CAT ACT CCA AAC C	diese Arbeit
B2M f	β_2-mikroglobulin	GAT GAG TAT GCC TGC CGT GTG	(Wellmann *et al.*, 2001)
B2M r	β_2-mikroglobulin	CAA TCC AAA TGC GGC ATC T	(Wellmann *et al.*, 2001)
B2M TM	β_2-mikroglobulin	CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT GTC TCG ATC CC	(Wellmann *et al.*, 2001)
VEGFex3 f	$VEGF_{165}$	CCC TGA TGA GAT CGA GTA CAT CTT	(Wellmann *et al.*, 2001)
VEGFex8 r	$VEGF_{165}$	ACC GCC TCG GCT TGT CAC	(Wellmann *et al.*, 2001)
VEGFex7ex5r	$VEGF_{165}$	AGC AAG GCC CAC AGG GAT TT	(Wellmann *et al.*, 2001)
TM VEGFex3	$VEGF_{165}$	ATC CTG TGT GCC CCT GAT GCG ATG CGG T	(Wellmann *et al.*, 2001)

Für die IL-8-Real-Time-PCR wurden folgende Kits verwendet:

Mastermix:

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I; Roche

Primer:

Humaner Interleukin 8 (IL-8) LightCycler-Primer Set; Roche

Humaner Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PDH) LightCycler-Primer Set; Roche

2.1.7. Oligonukleotide für quantitative PCR

Gen/Primer	Sequenz [5'- 3'; forward (f), reverse (r)]	Produkt (bp)	Quelle
ADM (f) ADM (r)	AAG AAG TGG AAT AAG TGG GCT TGG CTT AGA AGA CAC CAG AGT	410	(Mecklenburgh *et al.*, 2002)
β–Aktin (f) β–Aktin (r)	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA TAG AAG CAT TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG	660	diese Arbeit
c-IAP1 (f) c-IAP1 (r)	CAC ATG CAG CTC GAA TGA GAA C TCC AAG GCA GAT TTA ACC ACA GG	400	diese Arbeit
c-IAP2 (f) c-IAP2 (r)	CAT GCA GCC CGC TTT AAA ACA TTC CAT TTC CAC GGC AGC ATT AAT CAC	400	diese Arbeit
Cyclin G2 (f) Cyclin G2 (r)	GCA CTA TGA ATT GGA AGC TAC TAC TGC CAG GAG AAG AAT ACT CGG CTA GGC	329	diese Arbeit
FLJ22812 fis (f) FLJ22812 fis (r)	AGA GAC AGG GTT TCA CTA TAT GGG AGA TGT CAA GCC TGT AGG CC	442	diese Arbeit
Flt-1 (f) Flt-1 (r)	ACT CTA ATT GTC AAT GTG AAA CCC TAA CAT GAA ACC CAT TTG GC	424	diese Arbeit
GM-CSF (f) GM-CSF (r)	TGG ACT GGC TCC CAG CAG TCA AAG GGG ATG ACA CTG CTG CTG AGA TGA ATG AAA CAG TAG	286	(Kampik *et al.*, 2000)
HK 2 (f) HK 2 (r)	TCA ACC CCG GCA AGC AGA GG CCG CCG GGC CAC CAC AGT	287	(Pilegaard *et al.*, 2002)
ICAM-1 (f) ICAM-1 (r)	AAA GGA TGG CAC TTT CCC AC TTC CCC TCT CAT CAG GCT AGA C	595	diese Arbeit
IL-1ß (f) IL-1ß (r)	AAA CAG ATG AAG TGC TCC TTC CAG G TGG AGA ACA CCA CTT GTT GCT CCA	391	(Kampik *et al.*, 2000)
IL-8 (f) IL-8 (r)	ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT CTC TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C	300	diese Arbeit
KDR (f) KDR (r)	AGT CCA ATC ACA CAA TTA AAG CG CTT CTC CAT TCT TCA CAA GGG	346	diese Arbeit
KIAA0742 (f) KIAA0742 (r)	ACA AAC ATG GTG TGT TGC GG GTA AGC AGC ACC CTG TTG GC	368	diese Arbeit
MCP-1 (f) MCP-1 (r)	TCT GTG CCT GCT GCT CAT AGC GGG TAG AAC TGT GGT TCA AGA GG	518	(Kampik *et al.*, 2000)
NDRG1 (f) NDRG1 (r)	TGG AGT CCT TCA ACA GTT TGG G AGT ACT TGA AGG CCT CAG CG	554	diese Arbeit
PHD1 (f) PHD1 (r)	GGC GAT CCC GCC GCG C CCT GGG TAA CAC GCC	183	(Metzen *et al.*, 2003)

PHD2 (f) PHD2 (r)	GCA CGA CAC CGG GAA GTT CCA GCT TCC CGT TAC AGT	176	(Metzen *et al.*, 2003)
PHD3 (f) PHD3 (r)	GGC CAT CAG CTT CCT CCT G GGT GAT GCA GCG ACC ATC A	175	(Metzen *et al.*, 2003)
STC 2 (f) STC 2 (r)	CAA CTC TTG TGA GAT TCG GG GAG GTG ATG TCC TGC TTC CC	520	diese Arbeit
Tie-2 (f) Tie-2 (r)	CTG CAG TGC AAT GAA GCA TGC C GCT TTT CCA CCA TCC CAG CC	421	diese Arbeit
VEGF$_{gesamt}$ Primer A (f) VEGF$_{gesamt}$ Primer A (r)	TCC AGG AGT ACC CTG ATG AG ATT CAC ATT TGT TGT GCT GT	204	(Morii *et al.*, 1993; Grutzkau *et al.*, 1998)
VEGF$_{121, 165, 189, 206}$ Primer B (f) VEGF$_{121, 165, 189, 206}$ Primer B (r)	CGA AGT GGT GAA GTT CAT GGA TG TTC TGT ATC AGT CTT TCC TGG TGA G	403, 535 607, 658	(Morii *et al.*, 1993; Grutzkau *et al.*, 1998)

2.1.8. DNA-Primer

<KAN-2>FP-1 (3'-Ende des Transposons)	5'-ACC TAC AAC AAA GCT CTC ATC AAC-3'	Epicentre Technologies, Madison, WI, USA
<KAN-2>RP-1 (5'-Ende des Transposons)	5'-GCA ATG TAA CAT CAG AGA TTT TGA G-3'	Epicentre Technologies, Madison, WI, USA

2.1.9. Plasmide

Plasmid	**Beschreibung**	**Quelle**
VEGF$_{165}$-Plasmid	Standard für Real-Time-PCR, Plasmid mit Gen für Splicing-Variante VEGF$_{165}$	(Wellmann *et al.*, 2001)
KIAA0742-Plasmid: DKFZp686C2431Q2 Vektor: pSPORT1-Sfi	Standard für Real-Time PCR	RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin

2.1.10. *si*RNA

*si*RNA	Sequenz (5'- 3'; forward, reverse)	Quelle
Non-silencing control	r(UUC UUC GAA CGU GUC ACG U)dTdT r(ACG UGA CAC GUU CGG AGA A)dTdT	Qiagen; Hilden
Non-silencing control (Rhodamin markiert)	r(UUC UUC GAA CGU GUC ACG U)dTdT r(ACG UGA CAC GUU CGG AGA A)dTdT	Qiagen; Hilden
HIF-1α *si*RNA	r(CUG AUG ACC AGC AAC UUG A)d(TT) r(UCA AGU UGC UGG UCA UCA G)d(TT)	Qiagen; Hilden
HIF-2α *si*RNA	r(CAG CAU CUU UGA UAG CAG U)d(TT) r(ACU GCU AUC AAA GAU GCU G)d(TT)	Qiagen; Hilden

2.1.11. Größenstandards

Biotinylierte Protein Leiter	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Bench Mark Ladder (Protein Leiter)	Invitrogen, Karsruhe
1 kb Plus DNA-Leiter	Invitrogen, Karsruhe

2.1.12. Enzyme

Reverse Transkriptase: SuperScript II (200 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Roche, Mannheim

2.1.13. Inhibitoren

Actinomycin D	Sigma, Taufkirchen
MAP-Kinase-Inhibitor SB 202190	Calbiochem, Bad Soden
MG-132 (Proteasom-Inhibitor)	Calbiochem, Bad Soden
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail Complete™	Roche, Mannheim

2.1.14. Bakterienstämme

Bakterienstamm	**Beschreibung**	**Quelle**
Bartonella henselae Marseille	Wildtyp	(Drancourt *et al.*, 1996)
Bartonella henselae Houston I	ATCC 49882	(Regnery *et al.*, 1992)
Bartonella henselae Pil^-	häufig passagierter Marseille-Stamm, keine „Pilus“-Expression	(Kempf *et al.*, 2001)
Bartonella henselae $BadA^-$	Wildtyp mit integriertem Transposon in *badA*	(Riess *et al.*, 2004)
Yersinia enterocolitica pYV^+ (“WA-P”)	Virulenzplasmid vorhanden	(Heesemann J. and Grüter L., 1987)
Yersinia enterocolitica pYV^- (“WA-C”)	kein Virulenzplasmid	(Heesemann J. and Grüter L., 1987)
Escherichia coli HB 101	Laborstamm	(Boyer and Roulland-Dussoix, 1969)
Escherichia coli HB 101 pINV 1914 (“*E. coli* inv.$^+$”)	Expression von *Y. enterocolitica* Invasin	(Schulte *et al.*, 1998)
Escherichia coli	ATCC 25922	———
Legionella pneumophila	ATCC 33216	(Bibb *et al.*, 1983)

2.1.15. Bakterienkultur-Medien

Columbia-Blutagarplatten (5 % Schafsblut)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Legionella-buffered charoal yeast extract (B.C.Y.E.) α-Ketoglutarat Agar	Heipha Diagnostika, Heidelberg 2 g Aktivkohle 10 g Hefextrakt 10 g ACES/Puffer 250 mg Fe-Phosphat pH 6,9 1g Ketoglutarat 400 mg L-Cystein 17 g Agar ad. 1 l $H_2O_{dest.}$, pH 7,5
Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad. 1 l $H_2O_{dest.}$, pH 7,5
Einfriermedium für Bakterien	20 % Glycerol in LB-Medium

2.1.16. Zellkulturmedien

Die Medien für die Zellkultur wurden steril angesetzt und bei 4°C gelagert. Das FCS wurde vor der Benutzung 30 min bei 60°C im Wasserbad inaktiviert. Für Infektionsexperimente wurden Medien ohne FCS und ohne Antibiotika verwendet.

Zell-Linie	**Kultivierungsmedium**	**Infektionsmedium**
HeLa 229	RPMI 1640 (Biochrom) 10 % FCS (Hitzeinaktiviert) 1 % Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin	RPMI 1640 (Biochrom) 1 % Glutamin
Human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC)	Endothelial Cell Growth Medium mit Supplement Mix (PromoCell)	Endothelial Basal Medium ohne Supplement Mix (PromoCell)
EA.hy 926	RPMI 1640 (Biochrom) 10 % FCS (Hitzeinaktiviert) 1 % Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % Natriumpyruvat 1 % nicht essentielle Aminosäuren	RPMI 1640 (Biochrom) 1 % Glutamin 1 % Natriumpyruvat 1 % nicht essentielle Aminosäuren

2.1.17. Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

5 x Elektrophoresepuffer	60,55 g Tris/HCl 288,15 g Glycin 100 ml 10 % SDS ad 2 l $H_2O_{bidest.}$
2 x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer)	100 mM Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM Dithiothreitol 20 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 0,2 % Bromphenolblau

2.1.18. Gele und Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

5x Tris-Borat-Puffer (TBE)	54 g Tris base 27.5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad. 1 l $H_2O_{bidest.}$
OrangeG Probenauftragspuffer	10 ml H_2O 43,5 ml Glycerin (87%) 200 mg Orange G ad. 100 ml Lagerung der 1 ml Aliquots bei -20°C
1,5 % Agarosegel	1,5 g Agarose ad. 100 ml 0,5 x TBE

2.1.19. Gele, Lösungen und Puffer für Western Blotting

Blot-Puffer	3 g Tris 14,44 g Glycin ad. 1l $H_2O_{dest.}$
Waschpuffer (WPT)	18 g NaCl 20 ml 1 M Tris pH 7,4 4 ml Tween 20 ad. 2 l $H_2O_{dest.}$
Blockpuffer (3-5 % Magermilchpulver gelöst in WPT)	3-5 g Magermilchpulver gelöst in 100 ml WPT
Sammelgel 5% (3 ml)	2,1 ml H_2O 0,5 ml 30 % Acrylamidmix 0,38 ml 1 M Tris (pH 6,8) 30 µl 10 % SDS 30 µl 10 %iges APS 3 µl TEMED
Trenngel 8 % (10 ml)	4,6 ml H_2O 2,7 ml 30 % Acrylamidmix 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 100 µl 10 % SDS 100 µl 10 %iges APS 6 µl TEMED

Trenngel 12 % (10 ml)	3,3 ml H_2O 4,0 ml 30 % Acrylamidmix 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 100 µl 10 % SDS 100 µl 10 %iges APS 4 µl TEMED

Enhanced chemiluminescence (ECL) Detektion:	
Luminol	0,22 g Luminol ad. 5 ml DMSO in 250 µl Aliquots bei -20°C einfrieren
Cumarinsäure	0,075 g ad. 5 ml DMSO in 220 µl Aliquots bei -20°C einfrieren
Lösung 1	250 µl Luminol 220 µl Cumarinsäure ad. 25 ml Tris/HCl (100 mM, pH 8,5)
Lösung 2	15 µl H_2O_2 (30%) ad. 25 ml Tris/HCl (100 mM, pH 8,5)

2.1.20. Zell-Lyse-Puffer

Substanz	**Endvolumen 50 ml**	**absolute Konzentration**
Urea (MG 60,06)	21 g	7 mol/l
Tris/HCl pH 6,8 (1 M)	500 µl	10 mmol/l
Glycerol	5 ml	10 %
SDS	0,5 g	1 %
DTT	777 mg	5 mmol/l
PMSF	0,09 g	0,5 mmol
Protease Inhibitor Cocktail Complete™	1 Tablette	
$H_2O_{dest.}$	ad. 50 ml	

2.1.21. ELISA

Die VEGF-ELISAs (Quantikine® Human VEGF-Immunoassay und Duo Set® ELISA Development System human VEGF) wurden von der Firma R&D Systems, Wiesbaden bezogen.

IL-8-ELISA	
Waschpuffer	PBS + 0,05 % Tween 20
Blockierungspuffer	PBS + 10 % FCS
Substratpuffer	48,5 ml Diethanolamin 100 mg Natriumazid 400 mg $MgCl_2$ x 6 H_2O pH 9,8; ad. 500 ml $H_2O_{bidest.}$
Konjugat	4,5 µl Substanz A (Streptavidin) 4,5 µl Substanz B (Biotin-alkalische Phosphatase) 491 µl PBS mischen, 30 min inkubieren lassen; ad. 25 ml PBS
Entwicklerlösung	1 mg 4-Nitrophenyl Phosphat Dinatrium Salz Hexahydrat (PNPP) / ml Substratpuffer
Blockierungspuffer/Tween 20	PBS 10 % FCS 0,05 % Tween 20

2.2. Methoden

2.2.1. Herstellung definierter Bakterien-Stammkulturen für Zellkulturexperimente

Für die Infektionsexperimente wurden *Bartonella henselae* Marseille sowie Transposonmutanten (Riess *et al.*, 2003) verwendet. Die Bakterien wurden auf Columbia-Agar-Platten mit 5 % Schafsblut ausgestrichen und bei 37°C, 5 % CO_2 und 91 % Luftfeuchtigkeit bebrütet. Aufgrund der Kanamycin-Resistenz der Transposonmutanten wurden auf die Blutagarplatten je zwei Kanamycinplättchen (Konzentration: 30 µg) zur Kontrolle aufgelegt. Nach 5 Tagen wurden die Bakterien mit sterilen Wattestäbchen in Luria-Bertani (LB)-Medium geerntet, bei 4°C abzentrifugiert, in Einfriermedium (LB-Medium + 20 % Glycerin) resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Bakterienzahl/ml wurden 1 Tag nach dem Einfrieren 2-3 Aliquots aufgetaut, serielle Verdünnungsreihen in PBS hergestellt, diese auf Blutagarplatten ausplattiert und die Kolonien nach ca. 2-3 Wochen ausgezählt. Mittels dieser Verdünnungsreihen konnte die Bakterienanzahl rechnerisch ermittelt werden. Für Infektionsversuche wurden die Bakterien aufgetaut, mit PBS gewaschen (5 min, 2700 x g, 4°C), in entsprechendem Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine *multiplicity of infection* (MOI) von 250 eingestellt. *Yersinia enterocolitica* pYV^+ (WA-P) bzw. pYV^- (WA-C) wurden auf LB-Platten mit Nalidixin (Endkonz.:10 µg/ml) bei 27°C über Nacht kultiviert. *Escherichia coli* HB 101 und *E. coli* ATCC 25922 wurden auf Blutagarplatten, *E. coli* HB 101 inv^+ auf einer Blutagarplatte mit Ampicillin (Endkonz.:100 µg/ml) über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden bei 4°C aufbewahrt. Um regelmäßig frische Bakterien vorrätig zu haben, wurden diese jeweils nach einer Woche auf neue Agarplatten überimpft und kultiviert.

2.2.2. Präparation bakterieller chromosomaler DNA

Zur Präparation bakterieller chromosomaler DNA wurden zunächst *B. henselae*-Transposonmutanten (Riess *et al.*, 2003) auf Blutagarplatten, die 30 µg/ml Kanamycin enthielten, ausgestrichen und bei 37°C, 5 % CO_2 und 91 % relativer Luftfeuchtigkeit über 5 Tage bebrütet. Anschließend wurden sie mit Wattestäbchen abgenommen, in PBS resuspendiert und abzentrifugiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach den Angaben des Qiagen Genomic DNA Handbook. Die Zellpellets wurden in 1 ml B1-Puffer mit 0,002 % RNase A resuspendiert. Dann wurde jeweils 80 µl Lysozym und 100 µl Proteinase K zugeben

und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,2 ml B2-Puffer wurden die Proben für 30 min bei 50°C inkubiert. Währenddessen wurden Qiagen Genomic Tips mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Nach der Inkubation (30 min, 50°C) wurden die Proben resuspendiert und auf die Säulen gegeben. Nach Durchlaufen der Probe wurde die Säule zweimal mit 7,5 ml QC-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Säulen auf 15 ml-Reaktionsgefäße gesetzt und die chromosomale DNA wurde mittels 5 ml 50°C warmem QF-Puffer eluiert. Zur Präzipitation der DNA wurden 3,5 ml 100 %iges Isopropanol zum Eluat zugegeben. Nach Schütteln des Reaktionsgefäßes konnte die präzipitierte DNA mit einer Plastiköse entnommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt werden. Die DNA wurde in 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl destilliertem Wasser gelöst. Zur Quantifizierung und zur Reinheitskontrolle wurde die chromosomale DNA 1:20 in destilliertem Wasser verdünnt und am Photometer gemessen. Bei einer Extinktion$_{260/280}$ von 1,7 bis 1,9 wurde die Reinheit und Qualität der DNA als ausreichend betrachtet.

2.2.3. Präparation bakterieller Plasmid-DNA

Zur Präparation bakterieller Plasmid-DNA wurden zunächst 2 ml antibiotikahaltige (Endkonz.: 100 µg/ml) LB-Boullion mit dem entsprechenden Bakterium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die bewachsene LB-Boullion wurde am nächsten Tag in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (4°C, 5 min, 2700 x g). Die weitere Bearbeitung erfolgte nach den Angaben des Qiagen QIAprep Miniprep Handbuches. Die Zellpellets wurden in 250 µl P1-Puffer mit 0,002 % RNase A resuspendiert. Danach wurden 250 µl P2-Puffer in das Reaktionsgefäß dazugegeben und vorsichtig invertiert. Schließlich wurden 350 µl N3-Puffer in das Reaktionsgefäß pipettiert und wieder invertiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (4°C, 10 min, 17 000 x g), der Überstand vorsichtig in eine Säule pipettiert und wieder kurz zentrifugiert. Nach Durchlaufen der Probe wurde die Säule durch Zentrifugation mit 500 µl PB-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen und getrocknet. Danach wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl EB-Puffer durch kurze Zentrifugation aus der Säule eluiert. Zur Quantifizierung und zur Reinheitskontrolle wurde die DNA 1:20 in destilliertem Wasser verdünnt und am Photometer gemessen. Bei einer Extinktion$_{260/280}$ von 1,7 bis 1,9 wurde die Reinheit und Qualität der DNA als ausreichend betrachtet.

2.2.4. Zellkultur

Für Zellkulturexperimente wurden die humanen Endothelzell-Linien EA.hy 926 (Hybridzell-Linie entstanden aus Fusionierung von HUVEC und A549) und HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), sowie die humane Epithelzell-Linie HeLa 229 (Zervixkarzinomzell-Linie) verwendet. Die Kultivierung bzw. die *in vitro* Infektionsversuche wurden bei 37°C, 5 % CO_2 und 91 % Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Aufgrund der Kokultivierung der Zellen mit Bakterien und um die unspezifische Bildung von z.B. VEGF während der Infektionsexperimente zu vermeiden, wurden die Infektionen mit FCS- und antibiotikafreien Medien durchgeführt. Zur Kultivierung bzw. für die Infektionsexperimente wurden tiefgefrorene Zellen aufgetaut und in Zellkulturflaschen (Polystyren) ausgesät. Nach Adhärenz der Zellen am Flaschenboden entstand nach wenigen Tagen ein konfluenter Monolayer. Um die Zellen auf neue Flaschen aufzuteilen, bzw. um Zellen in 6-, 24- oder 96-Well-Platten (Polystyren) auszusäen, wurde der Monolayer zuerst kurz mit 3-5 ml Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen, danach mit der gleichen Menge an Trypsin/EDTA überspült und 2-5 min bei 37°C inkubiert, wodurch sich die adhärenten Zellen leicht vom Boden ablösen. Danach wurde das Trypsin/EDTA durch Zugabe der 1,5 fachen Menge an Medium inaktiviert. Zur Weiterkultivierung wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:6 in weitere Flaschen aufgeteilt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Um für Infektionsexperimente das Trypsin/EDTA aus der Suspension zu entfernen, wurden die Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert und zentrifugiert (5 min, 23°C, 500 x g). Danach wurde der Überstand abpipettiert, das Zellpellet in 50 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Die erforderliche Zellzahl/Well wurde rechnerisch ermittelt. Folgende Zellzahlen wurden ausgesät: 96-Well-Platte: 1-2 x 10^4 Zellen/Well; 24-Well-Platte: 1 x 10^5 Zellen/Well; 6-Well-Platte: 1 x 10^6 Zellen/Well. Da Endothelzellen (HUVEC) nur schlecht an Polystyrenoberflächen adhärieren, wurde der Flaschenboden sowie die Böden der 24- bzw. 6-Well-Platten, über Nacht mit Collagen G (Biochrom, Endkonzentration: 0,1 mg/ml) beschichtet, wofür das Collagen G (Stammlösung: 4 mg/ml) mit sterilem PBS 1:40 verdünnt wurde. Am nächsten Tag wurde das Collagen G aus den Flaschen bzw. Platten abgesaugt und diese bei 4°C aufbewahrt.

2.2.5. Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in Suspension wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypan-Blau 1:1 verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Multiplikation der Anzahl nicht blaugefärbter, lebender Zellen in einem Großquadrat (4 x 4 Felder) mit dem Kammerfaktor (1 x 10^4 Zellen/ml) und dem Faktor der Verdünnung mit Trypan-Blau ergab die Konzentration lebender Zellen in der ursprünglichen Zellsuspension. Um eine zuverlässige Zellzahl zu erhalten, wurden mehrere Großquadrate ausgezählt und die Werte gemittelt. Die Zellviabilität lag in allen Versuchen bei > 95 %.

2.2.6. Infektionsexperimente

2 h vor der Infektion wurde das antibiotikahaltige Medium durch FCS- und antibiotikafreies Medium ersetzt. Zur Infektion wurden die bei -80°C gelagerten Bakterien aufgetaut und das Einfriermedium durch Zentrifugieren (4°C, 10 min, 2700 x g) entfernt. Das Bakterienpellet wurde zunächst in 1 ml Infektionsmedium resuspendiert und dann auf die entsprechende MOI eingestellt, mit der die Zellen infiziert wurden. Als Positivkontrollen wurden entweder Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA, Endkonz.: 25 ng/ml), Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α, Endkonz.: 50 ng/ml) oder Desferrioxamin (DFO, Endkonz.: 200 µM bzw. 2 mM) verwendet oder Kontrollzellen unter Hypoxie inkubiert. Dazu wurden in einer 6- bzw. 24-Well-Platte ausgesäte Zellen in einen Anaerobentopf (Merck) gestellt. In den Anaerobentopf wurde ebenfalls ein Beutel AnaeroGen (OXOID), ein Anaerobier-System zur Erzeugung anaerober Bedingungen, sowie ein kurz mit Wasser angefeuchtetes Anaerotest-Teststäbchen (Merck), das die Anaerobiose innerhalb von 4-6 Stunden anzeigt, gegeben. Der Anaerobentopf wurde luftdicht verschlossen und für 6 h bei 37°C inkubiert. Einen Tag vor dem Infektionsexperiment wurden 5 ml LB-Medium mit *Y. enterocolitica* pYV$^+$ bzw. pYV$^-$, *E. coli* HB 101, HB 101 inv$^+$ oder *E. coli* ATCC 25922 angeimpft und über Nacht bei 27°C (*Y. enterocolitica*) bzw. bei 37°C (*E. coli*) kultiviert. Am nächsten Morgen wurde aus den Übernachtkulturen in LB-Medium eine Subkultur angeimpft und für weitere 2h bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Für die *Y. enterocolitica*-Kulturen wurde dem LB-Medium noch Nalidixin (Endkonz.: 100 µg/ml) und der *E. coli* HB 101 inv$^+$-Kultur Ampicillin (Endkonz.: 100 µg/ml) hinzugefügt. Der *E. coli* HB 101 inv$^+$-Kultur wurde zusätzlich eine halbe Stunde vor der Infektion IPTG (Endkonz.: 1 µl/ml) hinzugefügt, um die Invasinexpression zu induzieren. Nach der zweistündigen Inkubation (*Y. enterocolitica* pYV$^+$,

E. coli 37°C; *Y. enterocolitica* pYV$^-$ 27°C) wurden die Bakterien mit PBS gewaschen (2700 x g, 4°C, 5 min), in PBS resuspendiert und die optische Dichte mittels Photometer bestimmt, wobei die OD_{600nm} von 1 einer Konzentration von ca. 5 x 10^8 Bakterien/ml entspricht. Die *E. coli* Stämme wurden auf eine MOI 100, die *Y. enterocolitica* Stämme auf eine MOI 20 eingestellt. Durch serielles Ausplattieren der verwendeten Bakterien wurde die MOI auf ihre Richtigkeit hin überprüft. *L. pneumophila* wurde 4 Tage vor dem Infektionsexperiment auf einer *Legionella*-B.C.Y.E. α-Agar-Platte bei 37°C angezüchtet, am Infektionstag mit einem Wattestäbchen in PBS abgeerntet, gewaschen und die Konzentration, wie für *Y. enterocolitica* bereits beschrieben, eingestellt. Zur Infektion wurde ebenfalls eine MOI 100 verwendet. Nach der Infektion wurden die 6-, 24- oder 96-Well-Platten anzentrifugiert, um die Bakterien-Zell-Adhäsion zu erleichtern (500 x g, 23°C, 5 min) und für 6, 8, 24, 48 bzw. 72 h im Brutschrank (37°C, 5 % CO_2 und 91 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

2.2.7. RNA-Isolierung

Zur Bestimmung der Bildung von *messenger*-RNA (mRNA) zu einem Zeitpunkt in der Zelle wurde die Methode der Reversen Transkription (RT) sowie der Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) gewählt. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität erlaubt sie eine genaue Auswertung der zu untersuchenden mRNA, die in Zellkulturversuchen nur in geringer Quantität vorhanden ist. Die Isolierung der RNA aus dem Gesamtzell-Lysat der im 6-Well-Format ausgesäten und infizierten Zellen (1 x 10^6 Zellen/Well), wurde nach einer Inkubation von 6 h (37°C, 5 % CO_2, 91 % Luftfeuchtigkeit) mit dem RNeasy Mini Isolierungs-Kit (QIAGEN) durchgeführt. Da RNasen ubiquitär verbreitet sind und RNA relativ instabil ist, wurden alle Arbeitschritte auf Eis durchgeführt. Für die RNA-Isolierung und RT wurde Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser verwendet, um die enthaltenen RNasen zu inaktivieren. Weiterhin wurden sämtliche Arbeitsflächen, sowie potentiell kontaminierte Materialien, mit RNase-Away (MBP, Molecular Bio Products) gereinigt. Zuerst wurde β-Mercaptoethanol unter dem Abzug 1:100 mit RLT-Puffer verdünnt und die Zellen mit je 300 µl/Well lysiert. Das Lysat aus einem Well wurde in je ein RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Danach wurden 300 µl 70 % Ethanol in das Eppendorf-Reaktionsgefäß dazupipettiert. Diese Suspension wurde nun auf eine Säule gegeben und bei 4°C, 1 min, 20 000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde danach 1 mal mit RW1-Puffer (700 µl; 4°C, 1 min, 20 000 x g) und dann 2 mal mit RPE-Puffer (je 500 µl; 4°C, 2 min, 20 000 x g) gewaschen. Nach den Waschschritten

wurden die Säulen in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße gestellt, eine halbe Stunde getrocknet, mit 35 µl RNase freiem Wasser eluiert (4°C, 2 min, 20 000 x g) und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.8. Reverse Transkription (RT)

Um *copy*-DNA (cDNA) für eine quantitative PCR oder für eine Real-Time-PCR zu erhalten, wurde die isolierte RNA mittels RT in cDNA umgeschrieben. Das Enzym Reverse Transkriptase schreibt die mRNA-Stränge einer Probe in cDNA um, die dann ihrerseits mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert wird. Da sich die mRNA von anderen RNA Formen durch ein Ende mit mehreren aufeinanderfolgenden Adenin-Basen (Poly-A-Sequenz) unterscheidet, lässt sich diese spezifisch markieren, indem man DNA-Stränge aus Thymidin-Basen (Oligo-dT) zu den Proben gibt, die sich komplementär als Primer an die Poly-A-Sequenz anlagern (Primer-Annealing). An diesen Primer setzt nun die *Reverse Transkriptase* an und übersetzt den kompletten Strang in DNA. Da die isolierte Gesamt-RNA-Menge abhängig von der ursprünglichen Zellzahl in der Probe variiert, wurde für jede Probe der RNA-Gehalt mittels Photometer bestimmt, um für das weitere Vorgehen immer die gleiche RNA-Menge zu verwenden. Die photometrische Quantifizierung der RNA erfolgte bei 260 nm, da eine RNA-Lösung mit einer optischen Dichte (OD) von 1,0 eine Konzentration von 40 µg/ml besitzt. Das Photometer wurde zunächst mit einer mit Tris (10 mM, pH 8) gefüllten Quarzküvette auf einen Nullwert kalibriert. Um genaue Werte bei der RNA-Quantifizierung zu erhalten, wurden die Gesamt-RNA-Proben 1:40 in Tris (10 mM, pH 8) verdünnt. Der RNA-Gehalt errechnet sich dann folgendermaßen:

$$\text{Gemessener } OD_{260}\text{-Wert x Verdünnungsfaktor 40 x 40 µg/ml}$$

Das Verhältnis aus den Absorptionswerten bei 260 und 280 nm liefert eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA und somit über die Qualität der Gesamt-RNA, wobei der optimale Wert bei 2,0 liegt.

Für die RT wurden 1-2 µg RNA/Ansatz verwendet. Anhand des so bestimmten RNA-Gehaltes wurde für jede Probe die einzusetzende Menge an RNA in µl errechnet und in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Die benötigte Konzentration an RNA wurde zuerst mit DEPC-H_2O (Ambion) auf ein Volumen von 9 µl gebracht. Dazu wurden dann je Ansatz 500 ng/µl Oligo dT-Primer (GIBCO) pipettiert und der Reaktionsansatz auf ein Volumen von 10 µl gebracht, gevortext, kurz abzentrifugiert (4°C, 20 000 x g) und zum Primer-Annealing 10 min bei 65°C

im Heizblock inkubiert. Während der Inkubation wurde der RT-Mastermix **(Tab. 4)** auf Eis zusammenpipettiert, gevortext und kurz abzentrifugiert.

Tab. 4: 1x Ansatz für den Mastermix der RT.

Reagenzien	**Firma**	**1x Ansatz**
5x First-Stand-Buffer	Invitrogen	4,0 µl
RNase-Out	Invitrogen	1,0 µl
DTT 0,1 M	Invitrogen	2,0 µl
Nukleotide 10 mM	Invitrogen	2,0 µl
Super Script II Reverse Transkriptase 200 U/µl	Invitrogen	1,0 µl

Nach dem Primer-Annealing wurden die Proben kurz abzentrifugiert (4°C, 20 000 x g) und zum Abkühlen auf Eis gelagert. Danach wurden je 10 µl des Mastermixes zu den Reaktionsansätzen dazupipettiert und kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden nun für die RT 1 h bei 42°C im Heizblock inkubiert und danach zur Inaktivierung der *Reversen Transcriptase* für 5 min bei 90°C im Heizblock inkubiert. Danach wurde die cDNA kurz abzentrifugiert (4°C, 20 000 x g), in einem Verhältnis von 1:10 mit DEPC-H_2O auf ein Volumen von 200 µl verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.9. Semi-Quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um die Induktion bestimmter Gene in einer Zelle quantifizieren zu können, bedient man sich der Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR), bei der ein definiertes, zwischen zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primer) liegendes DNA-Fragment exponentiell amplifiziert wird. Für die Hot-Start-PCR wurde zuerst ein Mastermix **(Tab. 5)** auf Eis pipettiert. Von diesem wurden je 45 µl in ein PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt und dann je 5 µl der cDNA aus der RT dazupipettiert. Die PCRs wurden danach in einen PCR-Thermocycler nach den jeweiligen Programmen **(Tab. 6)** durchgeführt. Für alle cDNA-Proben wurden zuerst β-Aktin-PCRs als Kontrollen durchgeführt. β-Aktin ist ein „Haushaltsgen“, ein in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiertes Gen, mit dem die entsprechenden DNA-Banden relativiert werden können. Bei zu großen Unterschieden zwischen den β-Aktin-Banden wurde der Versuch wiederholt.

Tab. 5: Pipettierschema für den Mastermix einer PCR.

1x Ansatz für PCR-Mastermix (Endvolumen: 50 µl)	Firma	1x Ansatz
H_20 bidest.	—	25,1 µl
10x PCR-Puffer (+ 15 mM $MgCl_2$)	Roche	5,0 µl
Nukleotide (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roth	1,0 µl
Primer (je 2 µM)	Metabion	12,5 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	Roche	0,4 µl
cDNA	—	5,0 µl

Tab. 6: PCR Programme der durchgeführten quantitativen PCRs.

	Denaturierung	Denaturierung, Primer Annealing, Elongation	Ende	Pause
ADM	95°C-120 s	95°C-30 s, 57°C-30 s, 72°C-50 s, 32 Zyklen	72°C-120 s	4°C
β-Aktin		94°C-60 s, 72°C-150 s, 22 Zyklen	72°C-300 s	4°C
c-IAP1+2	94°C-120 s	94°C-30 s, 58°C-30 s, 72°C-30 s, 26 Zyklen	72°C-120 s	4°C
Cyclin G2	95°C-120 s	95°C-30 s, 61°C-30 s, 72°C-30 s, 24 Zyklen	72°C-120 s	4°C
FLJ22182 fis	95°C-120 s	95°C-30 s, 60°C-30 s, 72°C-50 s, 35 Zyklen	72°C-120 s	4°C
Flt-1	95°C-120 s	95°C-30 s, 53°C-30 s, 72°C-30 s, 23 Zyklen	72°C-120 s	4°C
GM-CSF	95°C-120 s	95°C-30 s, 67°C-30 s, 72°C-30 s, 30 Zyklen	72°C-120 s	4°C
HK 2	94°C-120 s	94°C-30 s, 58°C-50 s, 72°C-50 s, 10 Zyklen 94°C-30 s, 58°C-50 s, 72°C-50 s + 20 s je Zyklus, 15 Zyklen	—	4°C
ICAM-1	95°C-120 s	95°C-30 s, 59°C-30 s, 72°C-60 s, 26 Zyklen	72°C-120 s	4°C
IL-1ß	95°C-120 s	95°C-30 s, 60°C-30 s, 72°C-30 s, 30 Zyklen	72°C-120 s	4°C
IL-8	95°C-600 s	95°C-60 s, 60°C-150 s, 72°C-300 s, 25 Zyklen	—	4°C
KDR	95°C-120 s	95°C-30 s, 55°C-30 s, 72°C-30 s, 23 Zyklen	72°C-120 s	4°C
KIAA0742	95°C-120 s	95°C-30 s, 60°C-30 s, 72°C-50 s, 26 Zyklen	72°C-120 s	4°C
MCP-1	95°C-120 s	95°C-30 s, 61°C-30 s, 72°C-60 s, 23 Zyklen	72°C-120 s	4°C
PHD1	95°C-120 s	95°C-30 s, 57°C-30 s, 72°C-30 s, 27 Zyklen	72°C-120 s	4°C
PHD2	95°C-120 s	95°C-30 s, 55°C-30 s, 72°C-30 s, 27 Zyklen	72°C-120 s	4°C
PHD3	95°C-120 s	95°C-30 s, 58°C-30 s. 72°C-30 s, 30 Zyklen	72°C-120 s	4°C
NDRG1	95°C-120 s	95°C-30 s, 60°C-30 s, 72°C-30 s, 25 Zyklen	72°C-120 s	4°C
STC 2	95°C-120 s	95°C-30 s, 59°C-30 s, 72°C-30 s, 27 Zyklen	72°C-120 s	4°C
Tie-2	95°C-120 s	95°C-30 s, 59°C-30 s, 72°C-30 s, 23 Zyklen	72°C-120 s	4°C
VEGF	94°C-300 s	94°C-45 s, 60°C-60 s, 72°C-60 s, 35 Zyklen	72°C-300 s	4°C

2.2.10. Gelelektrophorese

Nach der Inkubation wurden die PCR-Produkte entweder vorerst bei -20°C aufbewahrt oder gleich mit OrangeG Ladepuffer in einem Verhältnis 1:10 versetzt und mittels Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden durch Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Ethidiumbromid) unter UV-Licht als Bande sichtbar gemacht. Der Vergleich der Bandenintensität der PCR-Produkte untereinander erlaubte somit eine zuverlässige quantitative Aussage über die Induktion der Genexpression in der Zelle zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion. Von den Proben wurden je 10 µl auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen, sowie 5 µl einer DNA-Leiter zur Kontrolle der Größe der PCR-Produkte. Das Gel wurde 45-90 min bei 90-120 V laufen gelassen, 10 min in einer Ethidiumbromid Lösung (1 µg/ml) gefärbt, 10 min in destilliertem Wasser entfärbt, mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage digital fotografiert und gespeichert. Die Gelbilder wurden mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop 6.0 aufbereitet.

2.2.11. Quantitative Real-Time-PCR

2.2.11.1. IL-8-Real-Time-PCR

Als weitere Methode zur Quantifizierung der Gen-Induktion in einer Zelle wurde die Real-Time-PCR verwendet. Zur Bestimmung der IL-8-Geninduktion wurde das Humane Interleukin-8 LightCycler™ -Primer Set, sowie als interne Kontrolle das Humane G-6-PDH LightCycler™ -Primer Set (Roche), ein in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiertes Gen, verwendet. Als 1-fach Reaktionsansatz wurde für die IL-8- sowie für G-6-PDH-Real-Time-PCR folgender Mastermix verwendet **(Tab. 7)**:

Tab. 7: Mastermix-Pipettierschema der IL-8- und G-6-PDH-Real-Time-PCR.

Primer (10 µM)	2,0 µl
LC-FastStart DNA Master SYBR Green I 10x (Roche)	2,0 µl
H_2O	11,0 µl

Zuerst wurde der Mastermix in die Light-Cycler Kapillaren vorgelegt. Anschließend wurden je 5 µl der unverdünnten cDNA in die Kapillaren pipettiert und der gesamte Ansatz in die Glaskapillaren zentrifugiert.

Als Standard wurden kommerzielle Standards (Roche) eingesetzt. Die Kopienzahl der kommerziell erhältlichen Standards variieren von Charge zu Charge und wurden in 10er-Verdünnungen für die PCR eingesetzt. Als Reaktionsbedingung wurde für die IL-8- sowie für G-6-PDH-Real-Time-PCR folgendes Programm verwendet **(Tab. 8)**:

Tab. 8: Programm für die IL-8- und G-6-PDH-Real-Time-PCR.

Denaturierung:	95°C, 10 min
Annealing:	Erniedrigung der Annealingtemperatur pro Zyklus um 0,5°C von 68°C auf 58°C, je 10 s
Amplifikation:	72°C, 16 s
Zyklenzahl:	45
Schmelzkurve:	von 58°C kontinuierliche Temperaturerhöhung von 0,1°C/s auf 95°C

Im LightCycler™ -Primer Set (Roche) wird der fluoreszierende Reporterfarbstoff SYBR® - Green I verwendet, der sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert und somit proportional zur Produktmenge ansteigt. Dadurch kommt es während der PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg, durch den die Reaktion verfolgt werden kann **(Abb. 3)**.

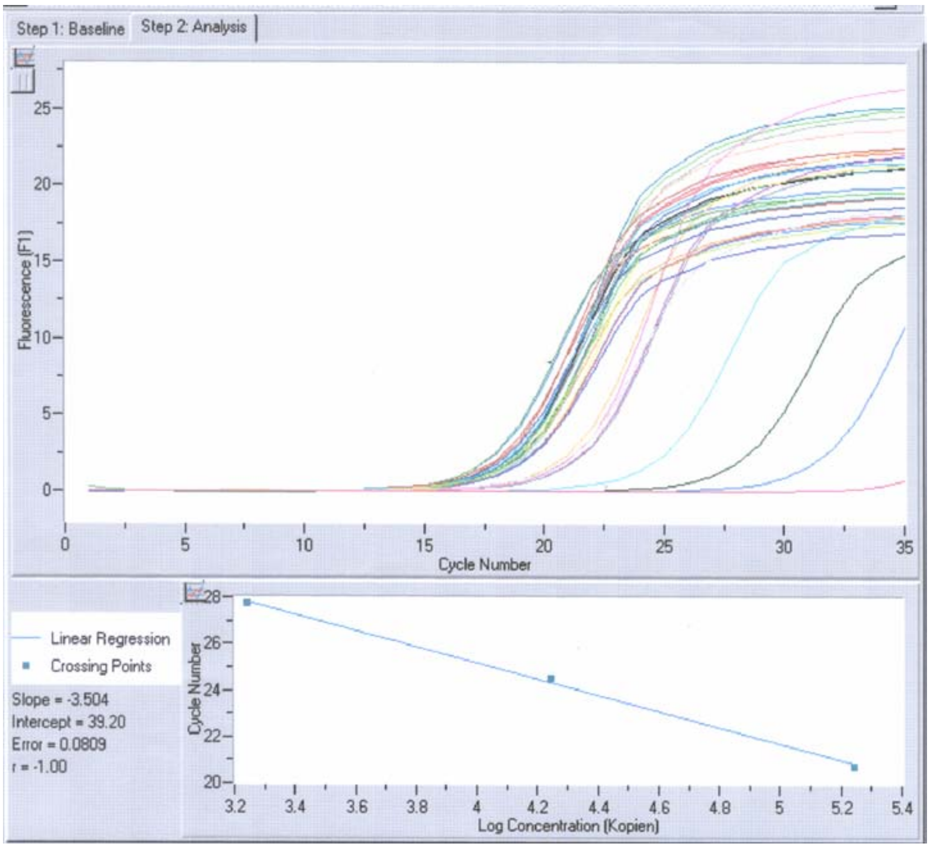


Abb. 3: Beispiel für eine Real-Time-PCR mit zugehöriger Standardgeraden.

Um zwischen korrektem Produkt, Artefakt oder Primerdimeren unterscheiden zu können, wird am Ende der PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der es durch schrittweise Erhöhung der Temperatur zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge, je nach ihrer Schmelzpunkte, in ihre Einzelstränge kommt. Folge ist eine Abnahme der Fluoreszenz, die aufgezeichnet wird. Da die Produkte von Primerdimeren und Mutationen bei niedrigeren Temperaturen schmelzen als die Produkte der Ziel-DNA, kann somit zwischen korrektem Produkt, Primerdimeren oder Artefakt unterschieden werden **(Abb. 4** und **5)**.

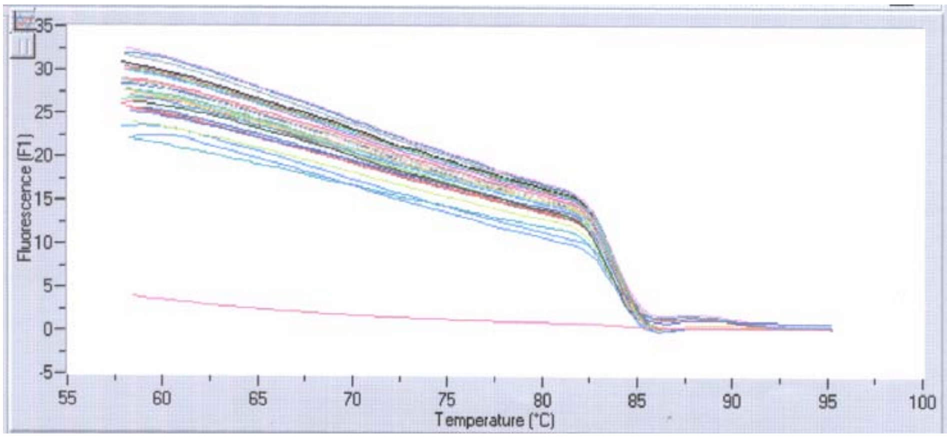


Abb. 4: Schmelzkurvenanalyse einer Real-Time-PCR.

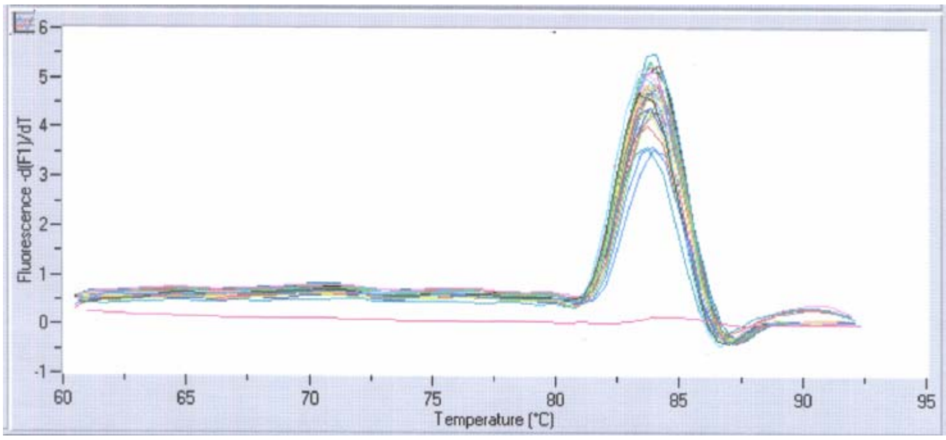


Abb. 5: Darstellung der Schmelzpunkte bei einer Real-Time-PCR.

2.2.11.2. VEGF-/KIAA0742-Real-Time-PCR

Zur Bestimmung der VEGF- und KIAA0742-Gen-Induktion mittels Real-Time-PCR wurden synthetisierte TaqMan-Sonden (TIB Molbiol; Berlin) verwendet. Als interne Kontrolle wurde das „Haushaltsgen“ β_2-Mikroglobulin verwendet. Bei einem TaqMan-Assay liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primern) ein weiteres fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (TaqMan-Probe). Unter einer TaqMan-Probe versteht man eine Sonde, die am

5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende oder intern mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist. Bei einer intakten Sonde wird die Reporterfluoreszenzemission durch die Nähe des Quenchers zum Reporter unterdrückt. Kommt es während der Reaktion zur Neustrangsynthese, fragmentiert die Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die TaqMan-Probe, woraus die Trennung des Reporters vom Quencher resultiert und somit die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird (**Abb. 6**).

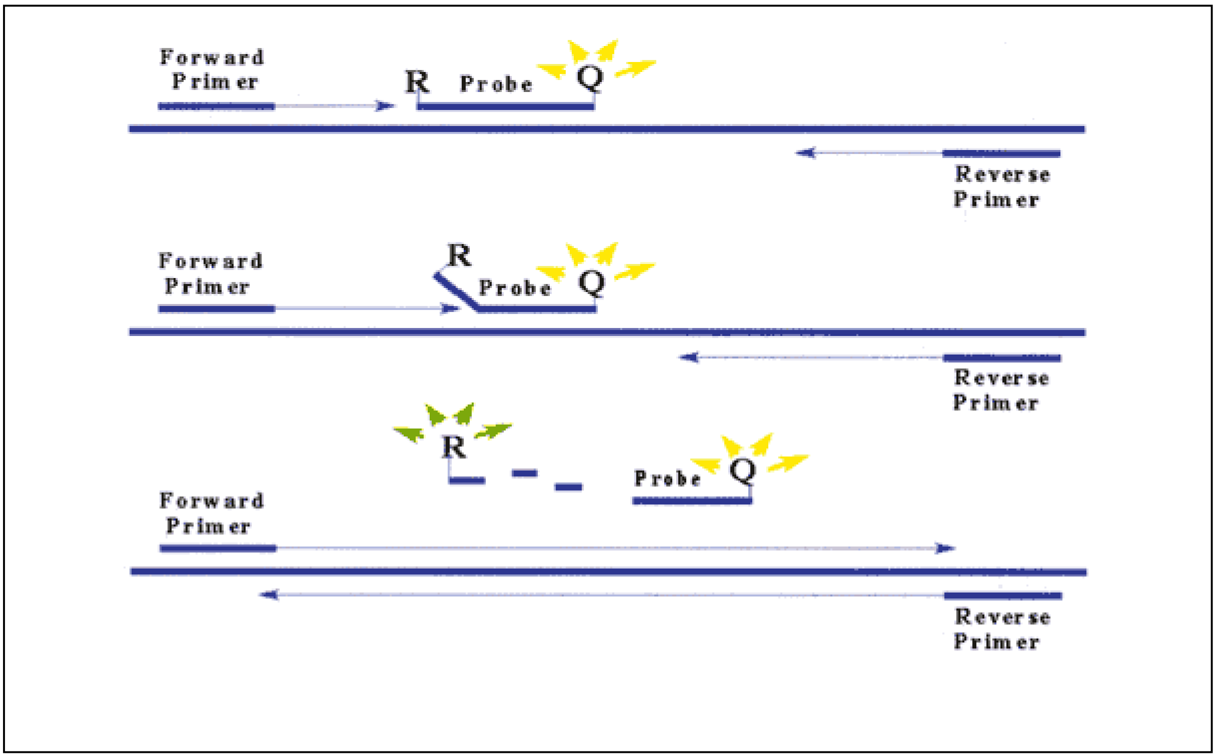


Abb. 6: Prinzip der Real-Time-PCR mittels TaqMan-Sonde (entnommen aus: Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch Real-Time PCR-Verfahren, D. Wilfingseder, H. Stoiber, Institut für Hygiene- und Sozialmedizin und Ludwig Bolzmann-Institut für AIDS-Forschung, Innsbruck, http://www.antibiotikamonitor.at).

Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist proportional zur Menge des DNA-Templates im Reaktionsgefäß. Die Taq-Polymerase bindet nur an TaqMan-Sonden, die an die Zielsequenz gebunden sind. Dadurch werden nur diese fragmentiert und nicht hybridisierte Einzelstränge bleiben unbeschadet. Vorteil einer Quantifizierung mittels Real-Time-PCR im Vergleich zur semi-quantitativen PCR ist, dass das entstehende PCR-Produkt ständig während der PCR gemessen werden kann. Somit ist in der linearen Phase der PCR-Reaktion eine Mengenbestimmung möglich, die zu genaueren Ergebnissen als bei der Endpunktmessung einer semi-quantitativen PCR führt. Die Quantifizierung der Real-Time-PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-

Schwellenwertes (Threshold Cycle, C_t-Wert). Der C_t-Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt (**Abb. 7**). Ab diesem Zeitpunkt ist die Amplifikation des PCR-Produktes exponentiell. Gleichzeitig werden in einem PCR-Lauf bekannte Templatemengen (Standard) amplifiziert, um eine Aussage über die Menge an Template zu einem bestimmten C_t-Wert machen zu können. Aus den bekannten Templatemengen kann eine Standardgerade erstellt werden, mit deren Hilfe man von einem bestimmten C_t-Wert auf die Templatekonzentration schließen kann.

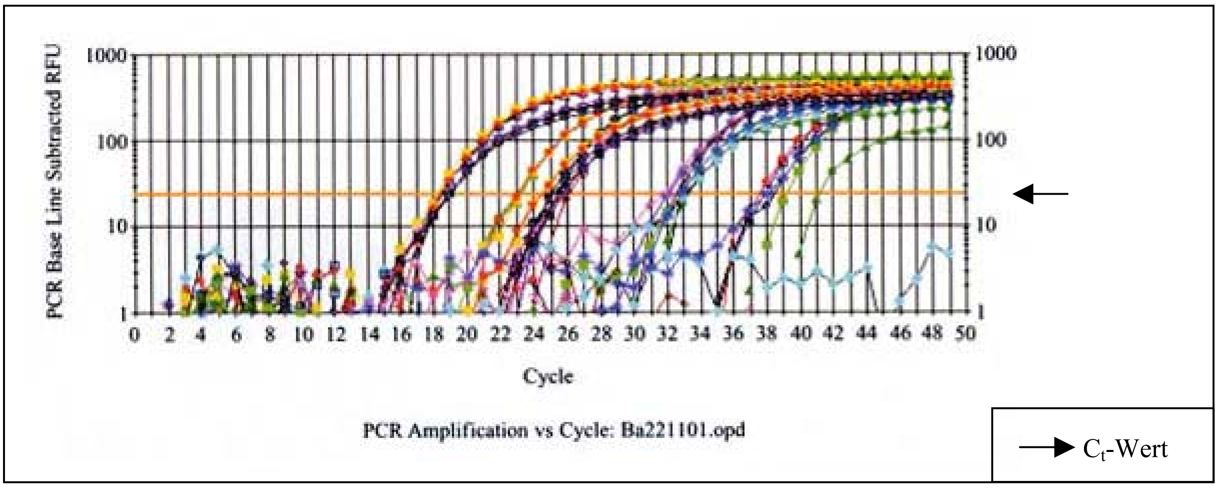


Abb. 7: Beispiel einer Datenanalyse mit C_t-Wert einer Real-Time-PCR (entnommen aus: Antibiotika Monitor – 1/2/02 – Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch Real-Time PCR-Verfahren, D. Wilfingseder, H. Stoiber, Institut für Hygiene- und Sozialmedizin und Ludwig Bolzmann-Institut für AIDS-Forschung, Innsbruck, http://www.antibiotikamonitor.at).

Für die VEGF- sowie für die KIAA0742-Real-Time-PCR wurde zuerst der Mastermix A in einem Eppendorf Reaktionsgefäß nach folgendem Schema pipettiert **(Tab. 9)**:

Tab. 9: Pipettierschema für Mastermix A.

Mastermix A (1 x)	
$H_2O_{bidest.}$	6,4 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	6,0 µl
10 x PCR-Puffer (ø $MgCl_2$)	2,0 µl
dNTPs (je 10 mM)	0,4 µl
BSA (10 µg/µl)	0,3 µl
Platinum Taq (5 U/µl)	0,15 µl

Danach wurde der Mastermix A für die VEGF- bzw. die KIAA0742-Real-Time-PCR nach folgender Tabelle in drei Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt und die dazugehörigen Primer (Endkonz.: 0,25 µM) sowie TaqMan-Probes (TM, Endkonz.: 0,1 µM) dazupipettiert **(Tab. 10** und **11)**.

Tab. 10: Pipettierschema für Mastermix B (KIAA0742).

Mastermix B (1 x)					
KIAA0742		**β2-Mikroglobulin**		**Standard**	
Mastermix 1	15,25 µl	Mastermix 1	15,25 µl	Mastermix 1	15,25 µl
Primer JMJD1 S	0,7 µl	Primer B2M f	0,7 µl	Primer JMJD1 S	0,7 µl
Primer JMJD1 A	0,7 µl	Primer B2M r	0,7 µl	Primer JMJD1 A	0,7 µl
Primer JMJD1 TM	0,4 µl	Primer B2M TM	0,4 µl	Primer JMJD1 TM	0,4 µl

Tab. 11: Pipettierschema für Mastermix B (VEGF).

Mastermix B (1 x)					
VEGF		**β2-Mikroglobulin**		**Standard**	
Mastermix 1	15,25 µl	Mastermix 1	15,25 µl	Mastermix 1	15,25 µl
Primer VEGFex3 f	0,7 µl	Primer B2M f	0,7 µl	Primer VEGFex3 f	0,7 µl
Primer VEGFex8 r	0,7 µl	Primer B2M r	0,7 µl	Primer VEGFex7ex5r	0,7 µl
Primer TM VEGFex3	0,4 µl	Primer B2M TM	0,4 µl	Primer TM VEGFex3	0,4 µl

Pro LightCycler Kapillare wurden 17 µl des Mastermix B vorgelegt. In die ersten beiden Kapillaren wurde jeweils der VEGF- bzw. KIAA0742-Mastermix pipettiert, in die dritte und vierte Kapillare jeweils der β2-Mikroglobulin-Mastermix. Danach wurde die cDNA 1:8 in $H_2O_{bidest.}$ verdünnt und 3 µl jeder Probe in vier Glaskapillaren pipettiert. In die zwei letzten Kapillaren wurde der Mastermix für den Standard vorgelegt, sowie je 3 µl einer Verdünnungsstufe des Standards. Als Standard für die VEGF-Real-Time-PCR wurde ein Plasmid verwendet, das die Splicing-Variante 165 des VEGF–Gens enthält (Wellmann *et al.*, 2001). Für die KIAA0742-Real-Time-PCR wurde als Standard ein kommerziell erhältlicher *E. coli* DH10B Klon (DKFZp686C2431Q2, RZPD, Berlin) verwendet, der ein Plasmid mit dem kompletten KIAA0742-Gen enthält. Die Ausgangs-Konzentration der Plasmide wurde auf eine Verdünnungsreihe von 10^3-10^6 Plasmiden/µl eingestellt. Um die absolute Kopienanzahl der Ziel-Transkripte zu bestimmen, wurden anhand der Verdünnungsstufen der $VEGF_{165}$- bzw. KIAA0742-Plasmide eine Standardgerade generiert. Die Anzahl der Kopien der zu untersuchenden Proben wurde anhand der LightCycler Software 3.1, bezogen auf die

Standardgerade, ermittelt (Wellmann *et al.*, 2001). Der gesamte Ansatz wurde in den Glaskapillaren zentrifugiert und nach folgender Reaktionsbedingung amplifiziert **(Tab. 12)**:

Tab. 12: Reaktionsbedingungen für VEGF- und KIAA0742-Real-Time-PCR.

Initiale Denaturierung:	95°C-2 min	
Denaturierung:	95°C- 8 s	40 Zyklen
Annealing:	68°C-12 s	
Extension:	72°C-20 s	
	35°C-120 s	

Danach wurde die Anzahl der amplifizierten Kopien nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Kopienanzahl des gesuchten Gens}}{\text{Kopienanzahl } \beta\text{2-Mikroglobulin}} \times 1000$$

2.2.11.3. Herstellung des Plasmidstandards für die KIAA0742-Real-Time-PCR

Zur Herstellung eines Standards wurde ein kommerziell erhältlicher *E. coli* DH10B Klon (DKFZp686C2431Q2, RZPD, Berlin) verwendet. Zuerst wurde mittels Kolonie-PCR überprüft, ob das Gen im Plasmid (pSPORT1-Sfi) enthalten ist. Dazu wurde der Klon mit Ampizillin-Resistenz zunächst auf einer LB-Platte mit Ampizillin (Endkonz.: 100 µg/ml) ausgestrichen und für 24 h bei 37°C, 5% CO_2, 91 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie des Klons von der LB-Platte gepickt, in einem Well einer 96-Well-Platte in 100 µl Millipore-H_2O resuspendiert und 2-3 min in einer Mikrowelle aufgekocht. Davon wurden 5 µl für einen herkömmlichen PCR-Ansatz (Kap. 2.2.9.) verwendet. Zur Detektion wurden 10 µl des Amplifikats auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen (Kap. 2.2.10.). Nachdem bestätigt wurde, dass das Gen im Plasmid enthalten ist, wurde eine Plasmidpräparation mit dem QIAprepspin MiniprepKit (Quiagen) nach Firmenprotokoll durchgeführt (Kap. 2.2.3.). Nach der Isolierung des Plasmids aus *E. coli* wurde die Konzentration des Plasmids mittels Photometer bestimmt. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt, wurde die Reinheit der DNA und die Qualität der Präparation nach folgender Formel bestimmt:

OD 260 nm / OD 280 nm = 1,8

Nach der Konzentrationsbestimmung wurde in folgenden Schritten die Verdünnungsreihe des Plasmidstandards rechnerisch erstellt:

- Berechnung des Mittelwerts der Plasmidkonzentration aus den Photometer-Messungen
- Berechnung der Plasmidgröße (Vektor mit Insert) in kb
- Berechnung des mittleren Molekulargewichts der Basen:

Plasmid (mit Insert) kb x 0,66 = mittleres Molekulargewicht der Basen (µg/pmol)

- Berechnung der Plasmidmenge (Mol):

$$\frac{\text{Mittelwert der Plasmidkonzentration (µg/µl)}}{\text{Mittleres Molekulargewicht der Basen (µg/pmol)}} = \text{Menge (mol/µl)}$$

- Berechnung der Molekülanzahl mittels Avogadro-Konstante:

Plasmidmenge (mol/µl) x 6,022 x 10^{23}/mol = Menge an Plasmiden/µl

- Herstellung einer Ausgangskonzentration der Plasmide
- Berechnung einer Verdünnungsreihe von $1x10^8$-$1x10^3$ Plasmiden/µl

Die Plasmide sowie Verdünnungsreihen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.12. Bestimmung der VEGF-mRNA-Stabilität mittels Real-Time-PCR

Zur Bestimmung der VEGF-mRNA-Stabilität wurden 1 x 10^6 HeLa-Zellen/Well im 6-Well-Format ausgesät und nach 24 h mit *B. henselae* Wildtyp (MOI 250) infiziert. Da bei *B. henselae*-infizierten Wirtszellen 6h nach Infektion mittels RT-PCR eine VEGF-mRNA-Neusynthese nachweisbar war, wurden die Zellen über 6 h mit den Bakterien inkubiert und danach das Medium abgesaugt. Zu der ersten Versuchsgruppe von nicht-infizierten bzw. infizierten Zellen (Kontrolle) wurde frisches Infektionsmedium pipettiert. In einem zweiten

Versuchsansatz wurden nicht-infizierte bzw. infizierte Zellen mit Actinomycin D (Act D, Endkonz.: 5 µg/ml) behandelt, welches die weitere mRNA-Neusynthese inhibiert. Parallel dazu wurde in einem weiteren Versuchsansatz die mRNA-Neusynthese, sowie die aktivierte p38 MAPK durch Zugabe des Inhibitors SB 202190 (Endkonz.: 10 µM) inhibiert. Die Zellen wurden danach für weitere 1 bzw. 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA transkribiert (vgl. Kap. 2.2.7. und 2.2.8.) und die VEGF-Induktion mittels Real-Time-PCR gemessen (vgl. Kap. 2.2.11.2.).

2.2.13. Gen-silencing durch Transfektion von *si*RNA

2.2.13.1. Transfektion

Um die Aktivierung von Genen, die in der Angiogenese eine wichtige Rolle spielen, durch den Transkriptionsfaktor HIF-1α zu bestätigen, wurde als Methode die Transfektion von *si*RNA (*small interfering* RNA) in die Wirtszelle gewählt. Dabei wurden kommerziell erhältliche *si*RNA und Transfektionsreagenz (Qiagen) verwendet. Bei einer Transfektion wird zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden:

<u>Transiente Transfektion</u>

Bei einer transienten Transfektion werden viele RNA- oder DNA-Kopien in die Zelle transportiert, die jedoch nicht in das Chromosom der Zelle integriert werden. Die transiente Transfektion führt zu einer hohen Expressionsrate des in die Zelle transportierten Gens.

<u>Stabile Transfektion</u>

Die stabile oder auch permanente Transfektion eignet sich nur für die Transfektion von DNA-Vektoren. Bei dieser Methode wird die transfizierte DNA entweder in die chromosomale DNA integriert oder bleibt als Episom erhalten. Die Integration eines DNA-Vektors ist ein seltenes Ereignis. In stabil transfizierte Zellen werden nur eine oder wenige Kopien der transfizierten DNA eingebaut. Folglich fällt die Expressionsrate des transfizierten Gens auch niedriger aus, als bei transient transfizierten Zellen.
Ebenfalls kann bei einer Transfektion zwischen verschiedenen Technologien unterschieden werden, von denen einige nachfolgend aufgelistet werden:

- DEAE (Diethylaminoethyl)-Dextran-Methode
- Kalzium-Phosphat-Methode
- Elektroporation
- Transfektion mittels nicht-liposomaler Lipide
- Transfektion mit Hilfe von kationischen Liposomen

Da in dieser Arbeit die liposomale Transfektion verwendet wurde, wird diese Technik nachfolgend näher beschrieben. Bei kationischen Liposomen handelt es sich um eine Mischung von kationischen sowie neutralen Lipiden **(Abb. 8),** die in einer Lipid-Bilayer-Struktur organisiert sind. Die Komplexbildung basiert auf einer Interaktion zwischen positiv geladenen Liposomen und negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Dieser Komplex wird durch Endozytose in Endosomen zunächst in die Zelle und danach in den Nukleus transportiert. Bisher ist allerdings noch nicht geklärt, wie die Nukleinsäuren aus den Endosomen freigesetzt werden und durch die nukleäre Membran gelangen

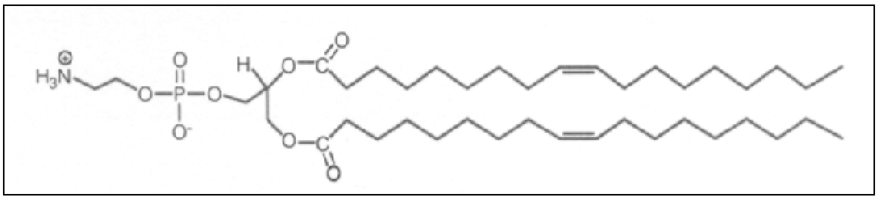


Abb. 8: Struktur eines kationischen Liposoms zur Transfektion (DOPE: L-dioleoyl phosphaditylethanolamin; Transfection Guide, www.promega.com; The QIAGEN Transfection Resource Book Second Edition, www.qiagen.com).

2.2.13.2. Gen-silencing mittels *si*RNA

Um die Aktivität eines Transkriptionsfaktors zu messen, ist es möglich, durch Transfektion von *small interfering* (*si*) RNA die Proteinbiosynthese des betreffenden Transkriptionsfaktors zu unterbinden. Dabei wird die mRNA des Transkriptionsfaktors durch den komplementären *si*RNA-RNA induzierten Silencing Komplex (RISC)-Komplex zerschnitten. Bei der *si*RNA handelt es sich um synthetisch hergestellte doppelsträngige 21-23 Basen lange Nukleotid-Fragmente. Diese Fragmente werden zu einem Ribonukleasekomplex (RISC-Komplex) rekrutiert. In einem ATP-abhängigen Vorgang trennt der RISC-Komplex die *si*RNA-Duplexe voneinander, wobei der Gegenstrang den aktivierten RISC-*si*RNA-Komplex zu seiner Ziel-mRNA führt und die Hybridisierung an die Ziel-mRNA sowie deren Degradierung leitet **(Abb. 9)**

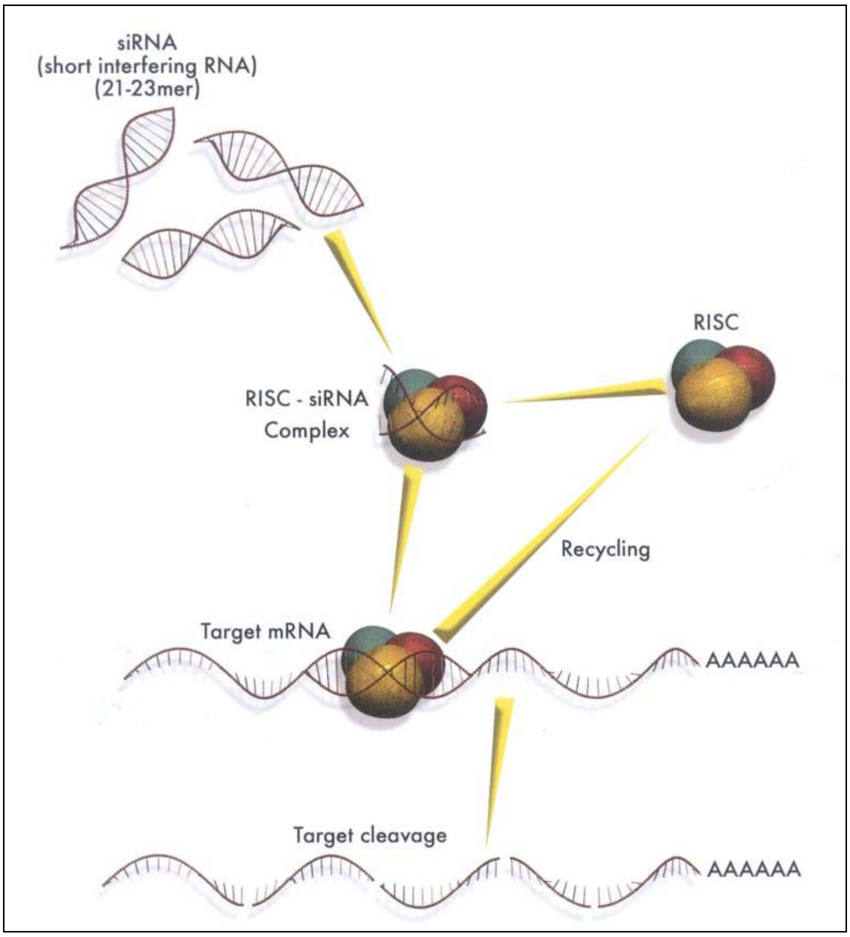


Abb. 9: Gen-Silencing vermittelt durch *si*RNA (*si*RNA Technology and Applications, www.biomol.de; small interfering RNAs (*si*RNA) A revolution in functional genomics, www.invivogen.com).

Für *si*RNA-Experimente wurden HeLa-Zellen im 24 Well- (1 x 10^4, 500 µl, VEGF-ELISA) bzw. 6 Well-Format (2,5 x 10^5, 2 ml, HIF-1α Western Blot) in Zellkulturmedium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 200 nM Kontroll (NS: non-silencing)- bzw. mit HIF-1α-*si*RNA gemäß des RNAiFect™ Transfektions-Handbuches (Qiagen) transfiziert. Um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen, wurde zusätzlich ein Well mit 200 nM Rhodamin-markierter Kontroll-*si*RNA (non-silencing) transfiziert, die nach 4 h unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden konnte. Danach wurde ein Mediumwechsel mit Zellkulturmedium durchgeführt und die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde für 2 h ein Mediumwechsel mit Infektionsmedium durchgeführt und dann die Zellen mit *B. henselae* (MOI 250) infiziert und für weitere 6 h (HIF-1 Aktivierung) bzw. 48 h (VEGF-Sekretion) inkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen mit Extraktionspuffer (Kap. 2.1.20) lysiert und der Western Blot nach Anleitung durchgeführt (Kap. 2.2.14. – 2.2.17.). Nach 48 h wurden die Überstände für den VEGF-ELISA in Reaktionsgefäße pipettiert, 5 min bei 20 000 x g und 4°C zentrifugiert, die Überstände aus den Reaktionsgefäßen in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren.

2.2.14. Präparation von Proteinextrakten

2.2.14.1. Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot mit Laemmli-Puffer

HeLa- bzw. HUVEC-Zellen (1 x 10^6) wurden einen Tag vor der Infektion in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. 6 h nach der Infektion wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 100 µl 2x Laemmli-Puffer (Kap. 2.1.17.) lysiert. Das entstandene Zell-Lysat wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 3-5 min auf einem Heizblock bei 98°C inkubiert. Anschließend wurden die Lysate zentrifugiert (2 min, 4°C, 20 000 x g) und bei -20°C gelagert.

2.2.14.2. Herstellung von Proteinextrakten zum Nachweis von HIF-1α

Da die HIF-1α-Untereinheit des Transkriptionsfaktors sehr instabil ist, wurde zur Zell-Lyse ein spezieller Extraktionspuffer verwendet. HeLa- bzw. HUVEC-Zellen (1 x 10^6) wurden einen Tag vor der Infektion in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. 6 h nach der Infektion wurden die Zellen mit eiskaltem PBS einmal gewaschen und anschließend mit 250 µl Lysepuffer (Kap. 2.1.20.) versehen. Das entstandene Zell-Lysat wurde unverzüglich in ein Eppendorf-Gefäß überführt und gekühlt. Verbliebene Zellreste wurden mit Hilfe einer Pipette vom Boden der 6-well-Platte gelöst und dem entsprechenden Eppendorf-Gefäß zugefügt. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Zell-Lysat 5 s bei maximaler Geschwindigkeit mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Gefäße 10 min im Heizblock bei 70 °C inkubiert. Gelagert wurden die Lysate bei -80°C.

2.2.15. Proteinbestimmung nach Bradford

Durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine tritt eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) ein. Dabei korreliert die Menge an Protein mit der Absorption bei 595 nm, die eine Quantifizierung des Proteingehaltes einer Lösung ermöglicht. Um die Gesamtproteinmenge der Proteinextrakte aus HeLa-Zellen zu bestimmen, wurden 5 µl davon 1:20 mit $H_2O_{dest.}$ verdünnt und in eine 96-Well-Platte überführt. Nach Zugabe von 20 µl Färbereagenz wurde die Absorption der

Lösung bei 595 nm im ELISA-Reader bestimmt. Mit bekannten Mengen an BSA (20; 2; 0,2 mg/ml) wurde eine Eichgerade erstellt und so die Proteinmenge der Extrakte bestimmt.

2.2.16. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei diesem Verfahren werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Masse getrennt. SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) als anionisches, amphiphatisches Detergens bindet im Verhältnis 1:1,4 pro Aminosäure an die kationischen Reste der Proteine und verleiht ihnen damit eine negative Überschussladung, die sich proportional zur Größe des Proteins verhält und welche die eigene Ladung der Proteine vernachlässigbar macht. Darüber hinaus nehmen alle SDS-denaturierten Proteine eine stäbchenförmige Konformation ein, welche den Einfluss der nativen Oberflächenstruktur auf die Wanderungseigenschaften der Proteine aufhebt. Die Proteine wandern daher im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten während der Elektrophorese ausschließlich von ihrer Größe abhängt. Die Trennung der Proteine im Gel erfolgt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes, wobei der Trennbereich über die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentrationen im Gel kontrolliert wird. Die Acrylamid-Konzentration kann zwischen 2 % und 30 % variieren und bestimmt die Porengröße des Gels. Zur optimalen Darstellung von HIF-1α mit einer Molekülgröße von 120 kDa wurde ein Trenngel mit einer 8 %igen Acrylamid-Konzentration gewählt **(Tab. 13)**.

Tab. 13: Pipettierschema für ein 8 %iges SDS-Trenngel.

8 %iges Trenngel	**ml**
H_2O	4,6
30% Acrylamid Mix	2,7
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10 % SDS	0,1
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	0,1
TEMED	0,006

Zuerst wurden die Komponenten Arcylamid/Bisacrylamid, Tris-Puffer, $H_2O_{bidest.}$ und SDS-Lösung pipettiert und dann die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS eingeleitet. Das Trenngel wurde in eine Vertikalkammer bis zu 2/3 des Endvolumens gefüllt und mit 0,1 % SDS überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach halbstündiger Polymerisation des Trenngels und Entfernung des 0,1 % SDS wurde das Sammelgel **(Tab. 14)** in das verbleibende Volumen der Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt.

Tab. 14: Pipettierschema für ein 3 %iges SDS-Sammelgel.

3 %iges Sammelgel	**ml**
H_2O	2,1
30% Acrylamid Mix	0,5
1,5 M Tris (pH 8,8)	0,38
10 % SDS	0,03
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	0,03
TEMED	0,003

Nach halbstündiger Polymerisation des Sammelgels erfolgte der Probenauftrag. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit 2 µl eines 2 x SDS-Probenpuffers (Kap. 2.1.17.) versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die SDS-Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurde in 1 x Elektrophorese-Puffer (Kap. 2.1.17) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel durchgeführt.

2.2.17. Western Blot

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine können aufgrund der negativen Ladung des gebundenen SDS elektrophoretisch weiter auf eine Nitrozellulose- oder Polyvinylidendifluorid (PVDF) -Membran übertragen werden (Western Blot). Dabei wird das SDS im Laufe des Transfers abgetrennt. Anschließend können geblottete Proteine durch eine spezifische und sehr sensitive Antikörperreaktion nachgewiesen werden (Towbin *et al.*, 1992). Für den Proteintransfer von SDS-Gelen auf eine PVDF-Membran wurde die Membran zuerst kurz in Methanol eingelegt und daraufhin für 2 min in $H_2O_{dest.}$ gewaschen. Anschließend wurde das Gel auf die Membran gelegt und von beiden Seiten mit je einer Lage Whatman-Filterpapier und je einem Schwamm bedeckt. Diese Schichtung wurde in eine Bio-Rad-Blotkammer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in Blot-Puffer (Kap. 2.1.19.) bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA für 60 min. Nach dem Blotten wurde die Membran zum Fixieren der Banden kurz in Methanol getaucht und luftgetrocknet. Die Effizienz des Transfers wurde durch reversible Proteinfärbung mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S überprüft. Zur Blockierung von freien Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (Kap. 2.1.19.) auf einem Gelschüttler inkubiert. Nach der Blockierung wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Gelschüttler mit anti-HIF-1α-Antikörper (1:1000 verdünnt in Blockpuffer) inkubiert. Nach dem Waschen der Membran mit Waschpuffer (3 x 5 min, 23°C; Kap. 2.1.19.) wurde die Membran mit einem

Sekundär-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war (anti-Maus, 1:1000 verdünnt in Blockpuffer), für 1 h auf einem Gelschüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 × 5 min mit Waschpuffer) wurde die Membran mit ECL-Reagenz ca. 5 min inkubiert und im Anschluss daran zwischen zwei Folien in eine Entwicklerkassette gelegt. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde im Dunkeln für 2-10 min ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR Film XAR-5; Sigma) auf die Membran gelegt, der anschließend maschinell entwickelt wurde.

2.2.18. Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen mittels ELISA

2.2.18.1. Gewinnung von Zellkulturüberständen

Zur Bestimmung der Menge an sekretierten Proteinen in einem Infektionsexperiment wurden 2 x 10^4 Zellen/Well im 96-Well-Format bzw. 1 x 10^5 Zellen/Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurde für 2 h ein Mediumwechsel mit Infektionsmedium durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 48 h bzw. 72 h mit den Bakterien infiziert (*B. henselae* MOI 250, 500, 5000). Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde aus dem 24-Well-Format 1 ml des Überstandes in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und bei 4°C, 20 000 x g, 5 min zentrifugiert. Danach wurden aus diesem Reaktionsgefäß 950 µl in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt. 250 µl des Überstandes aus den 96-Well Platten wurde in eine neue 96-Well-Platte überführt, bei 4°C, 4500 x g für 10 min abzentrifugiert. Zum Schluss wurden je 125 µl des Überstandes auf 2 neue 96-Well-Platten verteilt und bei -20°C eingefroren.

2.2.18.2. ELISA

Zum Nachweis der Zytokine in Zellkulturüberständen wurde ein VEGF-ELISA bzw. ein IL-8-ELISA benutzt. Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) eignet sich durch seine hohe Sensitivität dazu, im Zellkulturüberstand die geringen Konzentrationen der Proteine im Pikogrammbereich quantitativ nachweisen zu können. Dabei reagiert das zu messende Zytokin in einer Antigen-Antikörper-Reaktion als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (*capture antibody*), der an einer Mikrotiterplatte anhaftet. Ein hinzugegebener, enzymgekoppelter Sekundärantikörper (*detection antibody*) bindet ebenfalls an das Zytokin und katalysiert gleichzeitig eine Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Zytokinkonzentration und kann photometrisch bestimmt werden. Anhand

einer Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen (rekombinantes humanes (rh) IL-8, Pharmingen und rh VEGF, R&D Systems) wird die absolute Konzentration ermittelt.

2.2.18.2.1. VEGF-ELISA (DuoSet® ELISA Development System)

Zum Nachweis von VEGF mittels VEGF-ELISA (DuoSet® ELISA Development System) im Überstand wurden zunächst nach Protokoll der Herstellerfirma (R&D Systems) 96-Well ELISA-Platten mit je 100 µl/Well monoklonalem Primärantikörper (*capture antibody*) über Nacht beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten gewaschen und mit *Reagent Diluent* für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde der Waschschritt wiederholt, die Platten über Nacht unter der Sterilbank getrocknet und bei 4°C aufbewahrt. Zu Beginn des ELISAs wurden zuerst je 100 µl einer Standard-Verdünnungsreihe oder 100 µl der Zellkulturüberstände/Well pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der ELISA für weitere 2 h mit je 100 µl *Detection Antibody* inkubiert. Danach wurde der Waschschritt wiederholt und je 100 µl Streptavidin-HRP/Well pipettiert und 20 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer Entwicklerlösung hinzugegeben. Nach einer Inkubation von ca. 5 min wurde die Reaktion mit 50 µl Stoplösung beendet. Die Zytokinkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 540 nm im ELISA-Photometer bestimmt.

2.2.18.2.2. IL-8-ELISA

Zuerst wurden 50 µl des entsprechenden monoklonalen Primärantikörpers in einer Konzentration von 3 µg/ml in 0,1 M Na_2HPO_4 (pH 9) über Nacht bei 4°C in einer ELISA-Platte inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden danach durch viermaliges Waschen mit Blockierungspuffer/Tween 20 entfernt. Durch eine 2 h Inkubation mit Blockierungspuffer (Kap. 2.1.21.) bei Raumtemperatur wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden 100 µl der Zellkulturüberstände in die einzelnen Wells pipettiert. Als Standardkurve wurden verschiedene Konzentrationen (0-800 pg/ml) von rh IL-8, welches in Kulturmedium verdünnt wurde, verwendet. Die Reaktion der in den Kulturüberständen befindlichen Zytokine mit den an der ELISA-Platte gebundenen Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde erneut viermal gewaschen. Die Inkubation des biotinylierten Sekundärantikörpers (0,5 µg/ml, in

Blockierungspuffer/Tween verdünnt) erfolgte in einem Volumen von 100 µl für 1-2 h bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen wurden je 50 µl Konjugat (Kap. 2.1.21.) auf die einzelnen Wells verteilt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem letzten Waschschritt wurde PNPP in Substratpuffer (Kap. 2.1.21.) zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml aufgelöst und in einem Volumen von 50 µl/Well pipettiert. Nach einer Inkubation von 20 min bei 37°C, unter Abwesenheit von Licht, wurde die Zytokinkonzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einer Referenzlänge von 490 nm mit dem ELISA-Photometer bestimmt.

2.2.19. Statistik

Jedes Experiment wurde entweder im doppelten oder im dreifachen Ansatz durchgeführt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Die zu untersuchende Gruppe (infizierte Zellen) wurde jeweils mit der Kontrollgruppe (nicht-infizierte Zellen) verglichen. Die Datenbewertung erfolgte über den Student t-Test um die Gleichheit der Mittelwerte zu überprüfen. Die Differenz von Werten mit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1. Geninduktion in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*

Um das Genexpressionsmuster *B. henselae*-infizierter HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* (MOI 250) infiziert und über einen Zeitraum von 6 h inkubiert. Die mRNA wurde nachfolgend über U95A Affymetrix Gen-Chips analysiert (Kooperationsprojekt mit *cand. med.* J. Fiebig). Um Unterschiede in der Geninduktion zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen zu analysieren, wurden jeweils zwei Gen-Chips mit mRNA nicht-infizierter Zellen bzw. zwei Gen-Chips mit mRNA *B. henselae*-infizierter Zellen hybridisiert, miteinander verglichen und der Mittelwert aus den jeweiligen Geninduktionen errechnet. Im Vergleich zwischen nicht-infizierten und infizierten Zellen wurde ein bestimmtes Genmuster verstärkt transkribiert **(Tab. 15)**. Auf den Gen-Chips wurden im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle insgesamt zwanzig Gene mit einer mehr als 2-fachen Induktion nachgewiesen. Von sechs dieser Gene (IL-8, ADM, EFNA1, VEGF, IGFBP-3 und ET-2) ist bekannt, dass sie eine wesentliche Rolle in der Angiogenese spielen (Koch *et al.*, 1992; Kahn *et al.*, 2000; Öhler *et al.*, 2002; Yancopoulos *et al.*, 1998; Pandey *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 1989; Schmid *et al.*, 2003; Marvin *et al.*, 2002). VEGF ist hierbei von besonderem Interesse, da diesem vaskuloproliferativen Zytokin eine Schlüsselrolle sowohl in physiologischer als auch in pathologischer Angiogenese zukommt (Leung *et al.*, 1989). Neben den vaskuloproliferativen Genen konnte die Induktion von drei Genen (HK2, SLC2A3 und ENO2), die in der Glykolyse (Arora *et al.*, 1990; Semenza, 2001a), sowie die Induktion von acht Genen (NDRG1, STC-2, MAFF, NFIL3, CCNG2, HCN2, MXI1 und PAK2), die in der Signaltransduktion (Salnikow *et al.*, 2000; Motohashi *et al.*, 1997; Gottschalk *et al.*, 1993; Hunter and Pines, 1991; Wainger *et al.*, 2001; O'Hagan *et al.*, 2000; Knaus and Bokoch, 1998) eine Rolle spielen, gezeigt werden. Außerdem wurden drei Gene (KIAA0742, FLJ22182fis und FLJ20500) induziert, deren Funktion bisher unbekannt ist. Auffällig an dem Expressionsmuster war, dass außer IL-8 keine proinflammatorischen Gene und keine Gene, die in der angeborenen Immunität eine Rolle spielen induziert wurden. Außerdem wurden keine herabregulierten Gene beobachtet.

Tab. 15: Induzierte Gene in Epithelzellen (HeLa) 6h nach *B. henselae* Infektion.

Nr.	**Gen**	**Abkürzung**	**Induktion Array[a] U95A**	**Induktion Light Cycler[b] RT-PCR[c]**	**Transkriptions-faktor**	**Biologische Funktion**	**Genbank Zugangszahl**
vaskuläre Proliferation							
1.	Interleukin-8	IL-8	6.41	5.80[b]	NF-κB	angioproliferativ, proinflammatorisch	NM_000584
2.	Adrenomedullin	ADM	3.88	ja[c]	HIF-1	angioproliferativ	NM_001124
3.	Ephrin A1	EFNA1	3.74	n.d.	HIF-1	Modulation der Angioproliferation	NM_004428, NM_182685
4.	Vaskulo endothelialer Wachstumsfaktor	VEGF	3.54	5.10[b]	HIF-1	angioproliferativ	NM_003376
5.	Insulin-ähnliches Wachstumsfaktor - Bindeprotein-3	IGFBP-3	2.67	ja[c]	HIF-1	angioproliferativ	NM_000598
6.	Endothelin 2	ET-2	2.13	n.d.	HIF-1	Modulation der Angioproliferation	NM_001956
Glykolyse							
7.	Hexokinase 2	HK2	4.37	ja[c]	HIF-1	Schlüsselenzym der Glykolyse	NM_000189
8.	Glukose Transport Protein 3	SLC2A3	2.87	n.d.	HIF-1	Glukosetransport in die Zelle	NM_006931
9.	Enolase 2	ENO2	2.82	n.d.	HIF-1	Glykolyse	NM_001975
Signaltransduktion							
10.	Stanniocalcin-2	STC2	5.18	ja[c]	HIF-1	Signaltransduktion	NM_003714
11.	N-myc *downstream* reguliertes Gen 1	NDRG1	4.85	ja[c]	HIF-1	Signaltransduktion	NM_006096
12.	Muskuloaponeurotisches Fibrosarkoma Onkogen Homolog f	MAFF	4.45	n.d.	?	Transkription des Pol2 Promotor	NM_012323, NM_152878
13.	*nuclear factor* IL-3 reguliert	NFIL3	2.90	n.d.	HIF-1[d]	Transkription des Pol2 Promotor	NM_005384
14.	Zyklin G2	CCNG2	2.77	ja[c]	HIF-1	Kontrolle des Zellzyklus	NM_004354
15.	Hyperpolarisation-aktivierter zyklischer Nukleotid-*gated* Kaliumkanal 2	HCN2	2.68	n.d.	?	Signaltransduktion	NM_001194
16.	max-interagierendes Protein 1	MXI1	2.51	n.d.	?	Kontrolle des Zellzyklus	NM_005962, NM_130439
17.	p21-aktivierte Kinase 2	PAK2	2.26	n.d.	HIF-1[d]	Signaltransduktion	NM_002577
unbekannt							
18.	KIAA0742 Protein	KIAA0742	3.70	ja[c]	?	unbekannt	NM_018433
19.	Homo Sapiens cDNA	FLJ22182fis	2.85	ja[c]	?	unbekannt	NM_003979
20.	Hypothetisches Protein	FLJ20500	2.59	n.d.	HIF-1[e]	unbekannt	NM_019058

[a] Die Analyse von zwei voneinander unabhängigen Datensets wurde auf dem Affymetrix Microarray suite 5.0 und Affymetrix Data Mining Tool 3.0 durchgeführt.
[b] x-fache Induktion (Light Cycler) verglichen mit der Negativ-Kontrolle (VEGF: β1-Mikroglobulin normalisiert, IL-8: GAPDH-normalisiert)
[c] Detektion mittels konventioneller RT-PCRs
[d] indirekter Hinweis (Induktion durch Hypoxie)
[e] enthält HIF-1 responsive elements (NM_950668)
n.d.: nicht durchgeführt

3.2. Verifikation der Gentranskription *B. henselae*-infizierter HeLa-Zellen auf mRNA-Ebene

Um die Induktion einiger Gene, die auf dem Gen-Chip induziert waren, auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und quantitativer (Real-Time-) PCR zu bestätigen, wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* infiziert und sechs Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Zellkulturmedium abpipettiert, die mRNA aus dem Zell-Lysat isoliert, in cDNA transkribiert und die RT- bzw. quantitativen PCRs durchgeführt. Da das angioproliferativ und proinflammatorisch wirkende Zytokin IL-8 das einzige auf dem Array induzierte Gen war, das bekanntermaßen durch NF-κB reguliert wird (Koch *et al.*, 1992; Desbaillets *et al.*, 1997), wurden exemplarisch RT-PCRs von einigen NF-κB-regulierten Genen (ICAM-1, MCP-1, IL-1β und GM-CSF) durchgeführt, um die Genregulation weiterer NF-κB-regulierter Gene, die auf dem Array fälschlicherweise nicht nachgewiesen wurden, auszuschließen. Außerdem wurde die Genexpression eines endothelzellspezifischen VEGF-Rezeptors (KDR; Zeng *et al.*, 2003; Shibuya, 2003) in HeLa-Zellen überprüft **(Abb. 10),** da bekannt war, dass dieser in *B. bacilliformis*-infizierten Zellen exprimiert wird (Cerimele *et al.*, 2003).

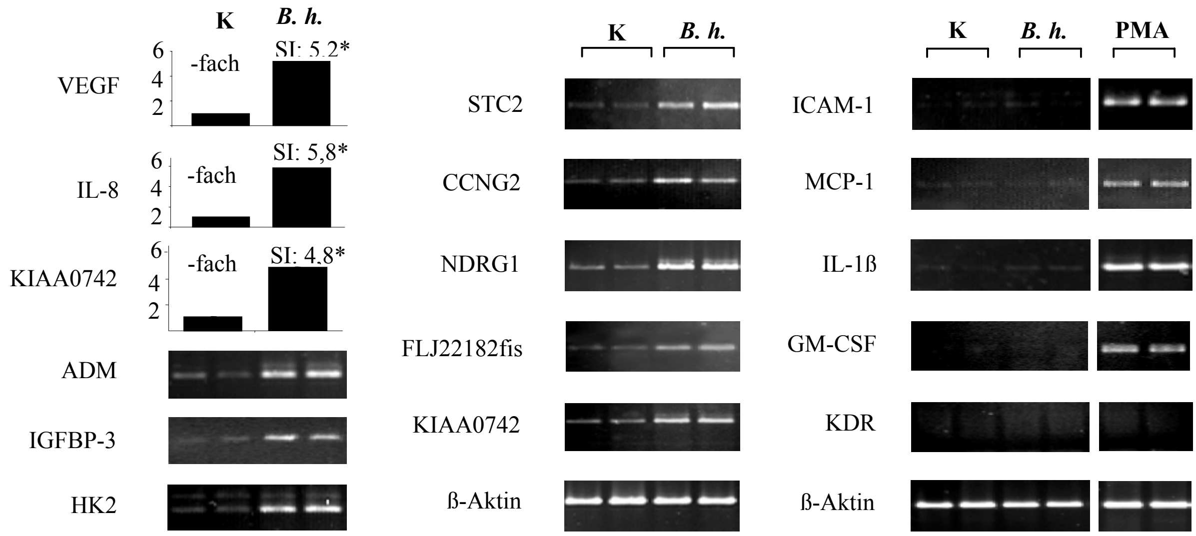


Abb. 10: Verifikation der Geninduktion in *B. henselae*-infizierten Hela-Zellen auf mRNA-Ebene. Analyse der Geninduktion mittels RT- bzw. quantitativer (Real-Time-) PCR. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250) infiziert und über 6 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde PMA (25 ng/ml) verwendet. Als interne Kontrolle für die RT-PCR wurde eine PCR mit einem *house keeping gene* (β-Aktin) durchgeführt, das in den Zellen konstitutiv exprimiert wird. Dabei lieferte die β-Aktin-PCR Bandenintensitäten gleicher Stärke. Als interne Kontrolle für die quantitative PCR wurde das *house keeping gene* β_2-Mikroglobulin verwendet. SI: Stimulationsindex, K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.: B. henselae*-infizierte Zellen, PMA: Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (Positiv-Kontrolle), *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0{,}05$) im Vergleich zur Negativkontrolle.

Wie in Abb. 10 zu sehen ist, konnte die Induktion von Genen, die in der Angiogenese (VEGF, IL-8, ADM, IGFBP-3 und STC-2), Glykolyse (HK2) sowie in der Signaltransduktion (CCNG2, NDRG1) eine Rolle spielen, auf RNA-Ebene mittels RT-PCR und quantitativer (Real-Time-) PCR verifiziert werden. Beim Vergleich zwischen nicht-infizierten (K) und *B. henselae*-infizierten (*B. h.*, MOI 250) Zellen konnte mittels VEGF- bzw. IL-8-Real-Time-PCR eine 5,2-fache VEGF- sowie eine 5,8-fache IL-8-Geninduktion nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA: 25 ng/ml) behandelt. Ebenfalls konnte für zwei der induzierten Gene (FLJ22182fis und KIAA0742; beide mit bislang unbekannter Funktion) die Induktion mittels RT-PCR bestätigt werden.

Um die semi-quantitativen Ergebnisse der KIAA0742-PCR zu verifizieren, wurde zusätzlich eine quantitative KIAA0742-Real-Time-PCR etabliert. Die Primer und TaqMan-Sonde wurden von TIB Molbiol, Berlin synthetisiert. Zur Herstellung des Standards wurde ein kommerziell erhältlicher *E. coli* DH10B Klon (DKFZp686C2431Q2, RZPD, Berlin), der das gesamte KIAA0742-Gen enthält, verwendet. Aus diesem Klon wurde das Gen mittels Plasmidpräparation (QIAprepspin MiniprepKit nach Firmenprotokoll durchgeführt, Quiagen, vgl. Kapitel 2.2.3.) isoliert, danach die DNA-Konzentration mittels Photometer bestimmt und die Verdünnungsreihe des Plasmidstandards rechnerisch eingestellt (Details: siehe Kapitel. 2.2.11.3.). Die zu untersuchenden Proben und der Standard wurden nach Protokoll (vgl. Kapitel 2.2.11.2., Tab. 8, 9) pipettiert und die Real-Time-PCR nach etablierten Reaktionsbedingungen (Tab. 11) durchgeführt. Im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zeigten *B. henselae*-infizierte Zellen eine um das 4,8-fach erhöhte KIAA0742-Geninduktion. Somit konnten anhand der quantitativen Real-Time-PCR die Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCR bestätigt werden.

Des weiteren konnte anhand einer exemplarischen Auswahl an bekannten NF-κB-regulierten Genen (ICAM-1, MCP-1, IL-1β und GM-CSF) ausgeschlossen werden, dass neben IL-8 noch weitere NF-κB-regulierte Gene durch *B. henselae* induziert werden. Mittels RT-PCR konnte in Übereinstimmung mit den Daten der Gen-Chip-Analyse weiterhin ausgeschlossen werden, dass der endothelzellspezifische VEGF-Rezeptor (KDR) in HeLa-Zellen nach *B. henselae*-Infektion induziert wurde. Als interne Kontrolle wurde eine PCR mit dem *house keeping gene* β-Aktin durchgeführt, das in Zellen konstitutiv exprimiert wird und ein deutliches Bandenmuster gleicher Intensität lieferte. Durch die Verifikation der Geninduktion anhand von RT- und quantitativer PCR in *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen konnte somit die Richtigkeit der Array-Daten bestätigt werden.

3.3. Analyse der Genexpression *B. henselae*-infizierter HeLa-Zellen auf Proteinebene

Nachdem die Gen-Chip-Daten auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnten, bestand die nächste Aufgabe darin, die Expression einiger auf dem Gen-Chip induzierter Gene mittels ELISA (VEGF, IL-8), Western Blot (STC2 und HK2) bzw. *radio immunofluorescence assay* (RIA: ADM und IGFBP-3) auf Proteinebene zu überprüfen. Für den ELISA bzw. RIA wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* infiziert und der Überstand nach 72 Stunden abgenommen. Die ADM- bzw. IGFBP-3-Sekretion (Kooperation: Dr. Burkhard Schütt, Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen) wurde mittels RIA gemessen. Für die Analyse der Proteinexpression von HK2 und STC2 wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* infiziert, Gesamtzell-Proteinextrakte hergestellt und diese mittels Western Blot analysiert **(Abb. 11)**.

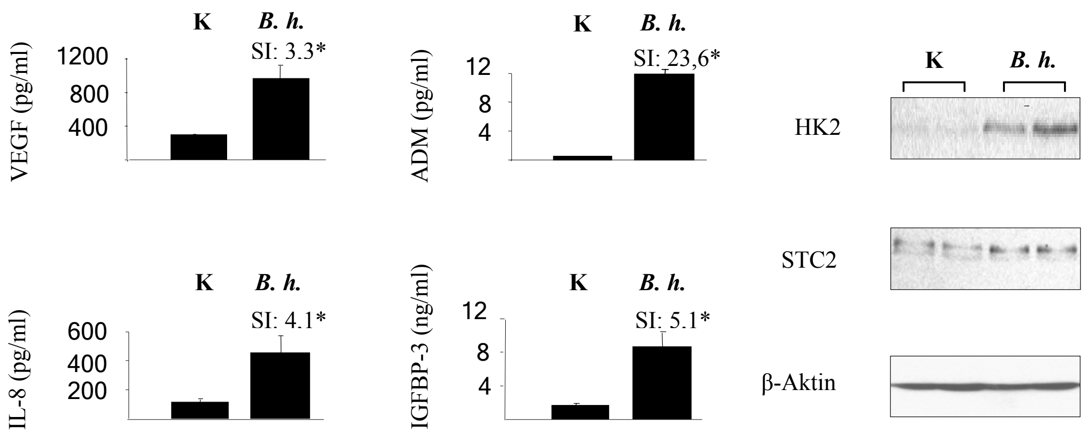


Abb. 11: Analyse der Genaktivität auf Proteinebene (ELISA, RIA und Western Blot). Messung der Proteinkonzentration mittels ELISA (VEGF, IL-8) und RIA (ADM, IGFBP-3). HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250) infiziert und der Überstand nach 72 h abgenommen. Zur Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot wurden HeLa-Zellen ebenfalls mit *B. henselae* infiziert (MOI 250) und die Zellen nach 2 h (STC2) bzw. 24 h (HK2) lysiert. Um zu gewährleisten, dass sich in allen Gesamtzell-Lysaten gleichviel Protein befindet, wurde als interne Kontrolle ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das *house keeping gene* β-Aktin durchgeführt, das konstitutiv exprimiert wird und ein einheitliches Bandenmuster ergab. Als interne Kontrolle für die Real-Time-PCR wurde das *house keeping gene* β_2-Mikroglobulin verwendet. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, SI: Stimulationsindex, *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen.

Wie schon auf dem Array zu erkennen war und mittels PCR verifiziert wurde, ist auf Proteinebene (Abb. 11) die Aktivität der Gene anhand ihrer Proteinexpression zu beobachten. Beim Vergleich zwischen nicht-infizierten (K) und *B. henselae*-infizierten Zellen (*B. h.*: MOI

250) konnte mittels ELISA eine 3,3-fache Erhöhung der VEGF-Proteinsekretion sowie eine Erhöhung der IL-8-Sekretion um das 4,1-fache beobachtet werden. Die Analyse der ADM- und IGFBP-3-Sekretion mittels RIA zeigte bei einem Vergleich zwischen *B. henselae*-infizierten und nicht-infizierten Zellen ebenfalls eine 23,6-fache Induktion der ADM- bzw. eine 5,1-fache Erhöhung der IGFBP-3-Sekretion. Die Proteinexpression von HK2 und STC2 wurde über Western Blot analysiert und zeigte eine deutliche Erhöhung nach Infektion der Zellen mit *B. henselae*. Um zu gewährleisten, dass sich in allen Gesamtzell-Lysaten gleichviel Protein befindet, wurde als interne Kontrolle ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das *house keeping gene* β-Aktin durchgeführt, das konstitutiv exprimiert wird und ein einheitliches Bandenmuster ergab. Somit konnte anhand dieser Untersuchungen die Induktion und Translation eines besonderen Genmusters nach einer *B. henselae*-Infektion von HeLa-Zellen bestätigt werden.

3.4. Regulierung der Genaktivität durch die Transkriptionsfaktoren HIF-1 und NF-κB

Für die meisten der im Gen-Chip induzierten Gene ist bekannt, dass sie direkt oder indirekt durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert werden (**Tab. 15**). Da der Transkriptionsfaktor HIF-1 aus einem α/β-Heterodimer besteht und die α-Untereinheit die entscheidende regulierbare Untereinheit darstellt (Wang *et al.*, 1995), kann die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 anhand der Aktivierung der α-Untereinheit nachgewiesen werden. Eine Ausnahme im Genexpressionsmuster auf dem Gen-Chip stellt das sowohl proinflammatorisch als auch angioproliferativ wirksame Zytokin IL-8 dar, das bekanntermaßen NF-κB-reguliert ist (Koch *et al.*, 1992; Desbaillets *et al.*, 1997). Es stellte sich nun die Frage, ob die Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren Folge einer *Bartonella*-Infektion ist und die NF-κB-regulierte IL-8-Induktion von der HIF-1-regulierten proangiogenetischen Zellantwort unterschieden werden kann. Als Teilprojekt dieser Doktorarbeit konnte *in vitro* anhand verschiedener Methoden gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren HIF-1 (Immunfluoreszenz, EMSA, Luziferase-Reportergenassay und Western Blot) und NF-κB (Immunfluoreszenz und EMSA) nach einer *B. henselae*-Infektion aktiviert werden (Kooperationsprojekt mit *cand. med.* U. Ehehalt und J. H. Wälzlein, **Anhang: Abb. 27, 28a, b**). Zudem konnte die HIF-1-Aktivierung *in vivo* anhand von Färbungen der HIF-1α-Untereinheit in Biopsaten verschiedener Patienten mit BA gezeigt werden **(Anhang: Abb. 29).** Weiterhin konnte durch NF-κB-Inhibition mittels Parthenolid

gezeigt werden, dass die NF-κB-vermittelte Zytokininduktion von der HIF-1-vermittelten proangiogenetischen Antwort abzutrennen ist, da die Zugabe des NF-κB-Inhibitors Parthenolid vor der Infektion zu einem starken Abfall der *B. henselae*-induzierten IL-8-Sekretion führt, die VEGF-Sekretion jedoch nur in geringem Maße beeinflußt wird **(Abb. 28c)**. Um den direkten Nachweis einer HIF-1-Aktivierung nach einer *B. henselae*-Infektion auf Proteinebene zu überprüfen, wurde HIF-1 mit Hilfe von *si*RNA gegen die HIF-1α-Untereinheit inaktiviert und die Auswirkung der *si*RNA auf die Expression von HIF-1 untersucht. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 wurde direkt über Western Blot, sowie indirekt über ELISA anhand der Menge des sekretierten VEGF bestimmt, da von diesem angioproliferativem Wachstumsfaktor bekannt ist, dass er HIF-1-abhängig reguliert wird (Semenza, 2001a). Zur Überprüfung der HIF-1-Aktivierung mittels Western Blot und ELISA wurden HeLa-Zellen 24 h vor Infektion mit 200 nM Kontroll-*si*RNA (nicht-komplementäre Fragmente zur mRNA der HIF-1α Untereinheit) oder mit 200 nM HIF-1α-*si*RNA (komplementäre Fragmente zur mRNA der HIF-1α-Untereinheit) transfiziert. Zur direkten Detektion der HIF-1-Induktion mittels Western Blot wurden die Zellen 6 h nach Infektion lysiert **(Abb. 12)**. Für die indirekte Bestimmung der HIF-1-Aktivierung anhand der VEGF-Sekretion wurde der Zellüberstand nach 72 Stunden abgenommen und mittels VEGF-ELISA vermessen **(Abb. 13)**.

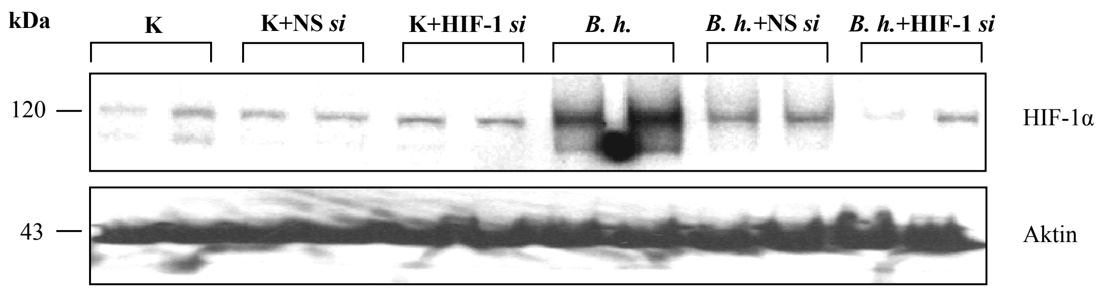


Abb. 12: Auswirkungen der HIF-1*a*-*si*RNA auf die HIF-1-Aktivierung nach einer *B. henselae*-Infektion. HeLa-Zellen wurden 24 h vor *B. henselae*-Infektion (MOI 500) mit HIF-1α-*si*RNA (200 nM) transfiziert und 6 h nach Infektion lysiert. Die Gesamtzell-Lysate wurden mittels Western Blot analysiert (anti-HIF-1α: 1:1000). Um zu gewährleisten, dass sich in allen Gesamtzell-Lysaten gleichviel Protein befindet, wurde als interne Kontrolle ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das *house keeping gene* β-Aktin durchgeführt, das konstitutiv exprimiert wird und ein einheitliches Bandenmuster ergab. K: nicht-infizierte Zellen, K+NS *si*: nicht-infizierte Zellen mit *non-silencing-si*RNA transfiziert, K+HIF-1-*si*: nicht-infizierte Zellen mit HIF-1α-*si*RNA transfiziert, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, *B. h.*+NS *si*: *B. henselae*-infizierte Zellen mit *non-silencing-si*RNA transfiziert, *B. h.*+HIF-1 *si*: *B. henselae*-infizierte Zellen mit HIF-1α-*si*RNA transfiziert.

Dass der Transkriptionsfaktor HIF-1α direkt durch *B. henselae*-Infektion aktiviert wird, zeigt sich deutlich in Abb. 12. Vergleicht man die nicht-infizierten Zellen untereinander, ist nur eine leichte, basale HIF-1-Aktivität zu erkennen, die nach Transfektion mit 200 nM non-silencing- (NS) *si*RNA oder HIF-*si*RNA unverändert bleibt. Infiziert man jedoch die Zellen mit *B. henselae* (MOI 500) führt das zu einem deutlichen Anstieg der HIF-1-Aktivität, wie an den starken Bandenintensitäten zu erkennen ist. Wurden die Zellen zusätzlich vor der Infektion mit 200 nM NS-*si*RNA transfiziert, wirkt sich dies nur unwesentlich auf die HIF-1-Aktivität aus. Im Gegensatz dazu führte jedoch die Transfektion mit HIF-*si*RNA bei infizierten Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität des Transkriptionsfaktors, wie an der Abnahme der Bandenintensität zu sehen ist, die sich nun auf dem Niveau der nicht-infizierten Zellen befindet.

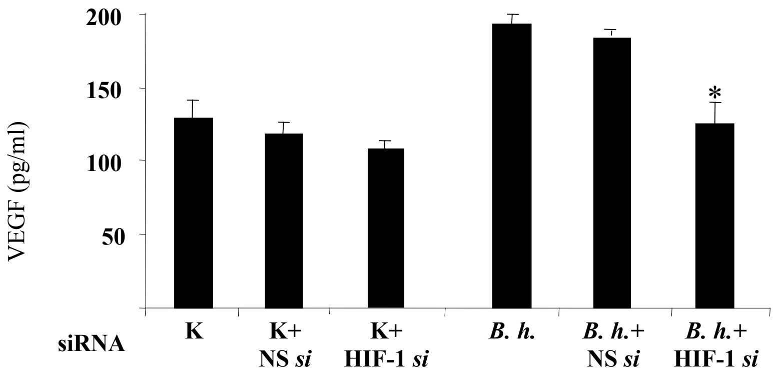


Abb. 13: Effekte der HIF-1*a*-*si*RNA auf die VEGF-Sekretion nach *B. henselae*-Infektion. HeLa-Zellen wurden 24 h vor *B. henselae*-Infektion (MOI 500) mit *si*RNA (200 nM) transfiziert und der Überstand 72 h nach Infektion abgenommen. Die VEGF-Proteinsekretion wurde mittels ELISA bestimmt. K: nicht-infizierte Zellen, K+NS *si*: nicht-infizierte Zellen mit *non-silencing-si*RNA transfiziert, K+HIF-1 *si*: nicht-infizierte Zellen mit HIF-1α-*si*RNA transfiziert, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, *B. h.*+NS *si*: *B. henselae*-infizierte Zellen mit *non-silencing-si*RNA transfiziert, *B. h.*+HIF-1 *si*: *B. henselae*-infizierte Zellen mit HIF-1α-*si*RNA transfiziert. *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0{,}05$) im Vergleich zu *B. henselae*-infizierten Zellen und *B. henselae*-infizierten Zellen, die mit einer *non-silencing-si*RNA transfiziert wurden.

Da die Expression von VEGF über HIF-1α reguliert wird (Semenza, 2001a), besteht eine indirekte Methode die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 darzustellen darin, die Menge des sekretierten VEGF, wie in Abb. 13 zu sehen ist, mittels ELISA zu messen. Bei einem Vergleich der Menge an sekretiertem Protein der nicht-infizierten Zellkulturüberstände zeigte sich zwar bei nicht-transfizierten sowie bei transfizierten Zellen (200 nM NS-*si*RNA oder HIF-*si*RNA) eine erkennbare HIF-1-Hintergrundaktivität, die jedoch nicht sehr stark divergiert (K: 129 +/- 12,5 pg/ml, K + NS *si*: 118 +/- 9,1 pg/ml, K + HIF *si*: 102 +/- 7,2 pg/ml). Die Infektion der Zellen mit *B. henselae* führte zu einer deutlichen Erhöhung der

VEGF-Sekretion (*B. h.*: 193 +/- 6,3 pg/ml), die durch Transfektion mit NS-*si*RNA jedoch kaum beeinflußt wurde (*B. h.*+NS *si*: 184 +/- 7,9 pg/ml). Transfizierte man die Zellen vor der Infektion jedoch mit HIF-1α-*si*RNA, führte dies wieder zu einer signifikanten Reduktion der VEGF-Sekretion (*B. h.*+HIF-1 *si*: 133 +/- 17,0 pg/ml), die auf dem gleichen Niveau wie die der nicht-infizierten Zellen lag. Somit konnte durch Inhibition der HIF-1α-Untereinheit mittels *si*RNA anhand von zwei verschiedenen Methoden (Western Blot, VEGF-ELISA) bestätigt werden, dass die durch *B. henselae*-induzierte Aktivierung von HIF-1 in einer VEGF-Expression resultiert.

3.5. Regulierung der HIF-1-Aktivität durch Prolylhydroxylasen

Seit kurzem ist bekannt, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 unter anderem durch Prolylhydroxylasen (PHD-1, -2, -3) reguliert wird, die unter normoxischen Bedingungen zwei Prolinreste (Pro402 und Pro564) der sauerstoffabhängigen Degradierungs-Domäne (ODD) hydroxylieren (Epstein *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1998). An diese hydroxylierten Prolinreste bindet das „von Hippel-Lindau“ Tumor Supressor Protein (pVHL), das Teil eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist und durch Ubiquitinylierung den proteosomalen Abbau von HIF-1α vermittelt (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1 nach *B. henselae*-Infektion auf RNA- sowie auf Proteinebene aktiviert wird. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass die PHD-2- und PHD-3-mRNA-Expression ihrerseits durch HIF-1α und HIF-2α reguliert wird, was einen negativen Feedback-Mechanismus darzustellen scheint (Aprelikova *et al.*, 2004). Somit bestand der nächste Schritt darin, die Induktion der Prolylhydroxylasen 1, -2, -3 durch *B. henselae* zu untersuchen. Dies wurde auf RNA-Ebene mittels semi-quantitativer PCR durchgeführt. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten lysiert (1, 3, 6, 24 und 48 h). Aus dem Zell-Lysat wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA transkribiert und die zu untersuchenden Gene (PHD-1, -2, -3) mittels PCR amplifiziert. Da die Infektion mit *B. henselae* erst nach 6 h zu einer erkennbaren Geninduktion der PHDs führte, ist in **Abb. 14** auch nur die Geninduktion zu diesem Zeitpunkt dargestellt.

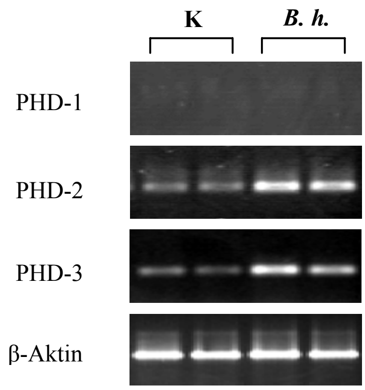


Abb. 14: Analyse der Geninduktion von PHD-1, -2, -3 nach *B. henselae*-Infektion. Messung der Geninduktion mittels semi-quantitativer PCR. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert und 6 h inkubiert. Um zu gewährleisten, dass jede Probe gleichviel cDNA enthält, wurde als interne Kontrolle eine PCR des *house keeping genes* (β-Aktin) durchgeführt, das in den Zellen konstitutiv induziert wird und eine Bandenintensität gleicher Stärke lieferte. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen.

Bei einem Vergleich nicht-infizierter und *B. henselae*-infizierter Zellen ist auf mRNA-Ebene eine deutliche Induktion von PHD-2 und PHD-3, nicht jedoch von PHD-1, zu erkennen. Als interne Kontrolle wurde eine PCR mit dem *house keeping gene* β-Aktin durchgeführt, das in Zellen konstitutiv exprimiert wird und ein Bandenmuster gleicher Intensität lieferte. Die Ergebnisse der RT-PCR haben gezeigt, dass eine *B. henselae*-Infektion zu einer Induktion der PHD-2 und PHD-3 mRNA führt. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass *B. henselae* in der Induktion der PHDs und damit in der Regulation der HIF-1-Aktivität eine Rolle spielt, die jedoch in weiteren Experimenten näher untersucht werden muss.

3.6. Posttranskriptionelle VEGF-Regulierung durch p38 MAPK

Eine *B. henselae*-Infektion führt zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und NF-κB. Eine Folge der NF-κB-Aktivierung ist die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8. Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass bei bakteriellen Infektionen die IL-8-Produktion durch Stabilisierung der mRNA durch phosphorylierte p38 MAPK (pp38) posttranskriptionell reguliert wird (Grassl *et al.*, 2003). Aus diesem Grund war von Interesse, ob eine *B. henselae*-Infektion ebenfalls zu einer Aktivierung von p38 MAPK führt. Die Analyse der Aktivierung der p38 MAPK wurde mittels Western Blot durchgeführt. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* (MOI 250) infiziert bzw. mit TNF-α (50 ng/ml) stimuliert und 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Zellüberstand entfernt und

die Zellen lysiert. Um die Aktivierung darzustellen, wurde ein Primärantikörper gegen die phosphorylierte p38 MAPK eingesetzt **(Abb. 15)**.

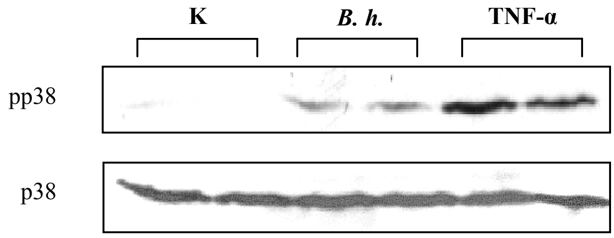


Abb. 15: Aktivierung von p38 MAPK nach *B. henselae*-Infektion. Darstellung der Aktivierung von p38 MAPK (pp38) 30 min nach *B. henselae*-Infektion. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250) infiziert oder mit TNF-α (50 ng/ml; Positivkontrolle) stimuliert und nach 30 min lysiert. Als interne Kontrolle wurde ein Western Blot gegen die nicht-phosphorylierte p38 MAPK (p38) durchgeführt. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, TNF-α: TNF-α-stimulierte Zellen.

Abb. 15 zeigt eine deutliche p38 MAPK Aktivierung nach einer *B. henselae*-Infektion. Da nicht-phosphoryliertes p38 konstitutiv exprimiert wird, wurde hierfür ebenfalls ein Western Blot als interne Kontrolle durchgeführt, der eine gleichmäßig starke Bandenintensität zeigte (unteres Bandenmuster). Somit konnte anhand dieses Experimentes gezeigt werden, dass eine *B. henselae* Infektion zur einer Aktivierung von p38 MAPK führt. Für aktivierte p38 MAPK ist zudem bekannt, dass sie außer in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren auch in der Stabilisierung von mRNA eine Rolle spielen (Holtmann *et al.*, 1999). Nachdem die Aktivierung von p38 MAPK durch *B. henselae* im Western Blot dargestellt werden konnte, bestand der nächste Schritt darin, mittels quantitativer PCR zu überprüfen, ob p38 MAPK an der posttranskriptionellen Regulierung von VEGF beteiligt sind. Dazu wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* (MOI 500) für 6 h infiziert, um die Transkription der mRNA zu induzieren. Nach der Infektion wurden die Zellen für weitere 1 bzw. 6 h mit dem RNA-Polymerase-Inhibitor Actinomycin D behandelt (Act. D; Endkonz.: 5 µg/ml), um eine weitere Transkription zu verhindern. Ein Teil der Zellen wurden zusätzlich mit dem p38 Inhibitor SB 202190 (Endkonz.: 10 µM) behandelt. Danach wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und die VEGF-mRNA mittels quantitativer PCR quantifiziert **(Abb. 16)**.

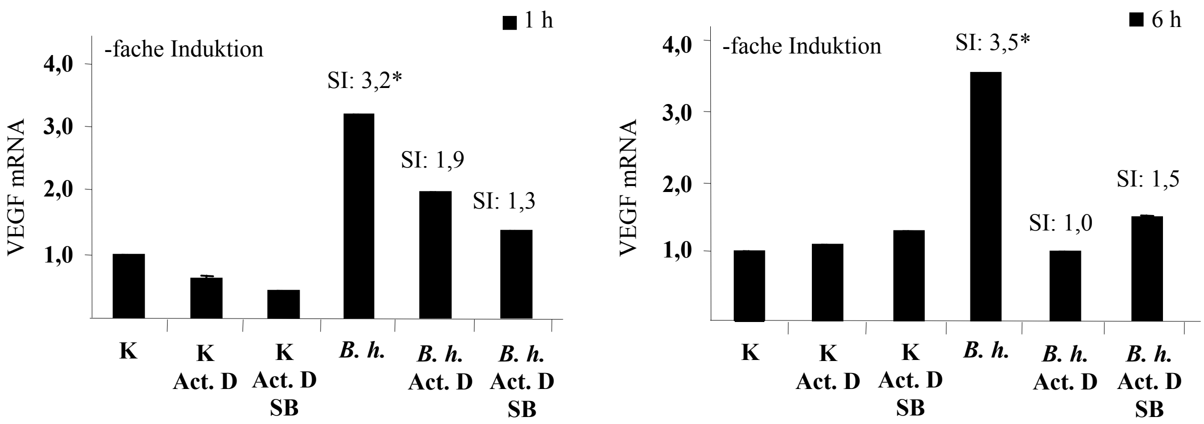


Abb. 16: Posttranskriptionelle Regulation der VEGF-Gentranskription in HeLa-Zellen nach *B. henselae*-Infektion. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert und für 6 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die nicht-infizierten bzw. infizierten Zellen zusätzlich mit Act. D bzw. mit Act. D und dem p38 Inhibitor SB 202190 (SB) behandelt. Nach einer weiteren ein- bzw. sechsstündigen Inkubation wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die Menge an VEGF-mRNA wurde mittels Real-Time-PCR gemessen. Als interne Kontrolle wurde das *house keeping gene* β_2-Mikroglobulin verwendet. K: nicht-infizierte Zellen, K + Act. D: nicht-infizierte Zellen + Actinomycin D, K + Act. D + SB: nicht-infizierte Zellen + Actinomycin D + SB 202190, *B. h.*: *B. hensela*- infizierte Zellen, *B. h.* + Act. D: *B. henselae*-infizierte Zellen + Actinomycin D, *B. h.* + Act. D + SB: *B. henselae*-infizierte Zellen + Actinomycin D + SB 202190, SI: Stimulationsindex, *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0{,}05$) im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen.

In Abb. 16 ist die Induktion der VEGF-mRNA nach 1 und 6 h dargestellt. Bei einem Vergleich der nicht-infizierten Zellen untereinander ist in beiden Zeitpunkten vor (1.03 +/- 0,03 Kopien; 1,95 +/- 0,14 Kopien) und nach Zugabe von Act. D (0,65 +/- 0,37 Kopien; 2,12 +/- 0,67 Kopien) oder Act. D und SB 202190 (0,42 +/- 0,08 Kopien; 2,48 +/- 0,11 Kopien) keine deutliche Änderung der VEGF-mRNA Menge zu erkennen. Eine Infektion der Zellen mit *B. henselae* lässt eine deutliche VEGF-Geninduktion (2,68 +/- 2,08 Kopien, 6,87 +/- 0,29 Kopien; SI: 3,2 bzw. SI: 3,5) erkennen. Wurden die *B. henselae*-infizierten Zellen zusätzlich mit Act. D behandelt, ist in beiden Zeitpunkten eine deutliche Abnahme der VEGF-mRNA zu erkennen (2,02 +/- 0,10 Kopien, 1,91 +/- 0,32 Kopien; SI: 1,9 bzw. SI: 1,0), die auf den mRNA-Zerfall zurückzuführen ist. Wurden die *B. henselae*-infizierten Zellen zusätzlich noch mit dem p38 Inhibitor SB 202190 behandelt, war keine weitere deutliche Reduktion der VEGF-mRNA (1,41 +/- 0,2 Kopien, 2,87 +/- 0,30; SI: 1,3 bzw. 1,5) zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen somit als Schlussfolgerung zu, dass die aktivierte p38 MAPK an der posttranskriptionellen Regulierung der VEGF-mRNA nicht beteiligt ist.

3.7. Abhängigkeit der Geninduktion bzw. Zytokin-Sekretion von der Expression von *B. henselae* BadA

Außenmembranproteine (OMP) von *B. henselae* sind als mögliche Pathogenitätsfaktoren beschrieben worden (Fuhrmann *et al.*, 2001; Burgess and Anderson, 1998). Außer diesen OMPs sind auch sogenannte „Pili“ als Pathogenitätsfaktoren beschrieben worden (Batterman *et al.*, 1995). Tatsächlich handelt es sich dabei um das nicht-fimbrielle Adhäsin BadA (Riess *et al.*, 2004). Um die Rolle von BadA in der Geninduktion angioproliferativ wirkender Zytokine nach einer *B. henselae*-Infektion zu untersuchen, wurden Zellen mit *B. henselae* Wildtyp oder mit einer *B. henselae* $BadA^-$ Mutante infiziert (MOI 250) und über 6 h inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und mittels semi-quantitativer PCR und Real-Time-PCR die Induktion einiger auf dem Array hochregulierter Gene analysiert (**Abb. 17**).

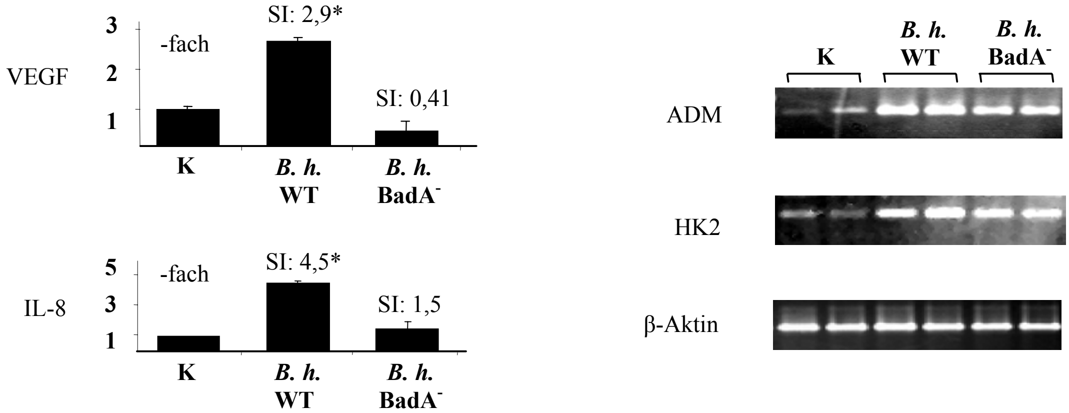


Abb. 17: Vergleich der Geninduktion in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* Wildtyp und *B. henselae* $BadA^-$. Messung der Geninduktion mittels Real-Time-PCR bzw. quantitativer PCR. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* Wildtyp (MOI 250) oder *B. henselae* $BadA^-$ (MOI 250) infiziert und 6 h inkubiert. Um zu gewährleisten, dass jede Probe gleich viel cDNA enthält, wurde als interne Kontrolle eine PCR eines *house keeping genes* (β-Aktin) durchgeführt, das in den Zellen konstitutiv induziert wird und eine Bandenintensität gleicher Stärke lieferte. Als interne Kontrolle für die Real-Time-PCR wurde das *house keeping gene* β_2-Mikroglogulin verwendet. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.* WT: *B. henselae* Wildtyp-infizierte Zellen, *B.h.* $BadA^-$: *B. henselae* $BadA^-$-infizierte Zellen. SI: Stimulationsindex, *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Negativkontrolle.

Wie in Abb. 17 zu sehen ist, konnte ein Unterschied in der Geninduktion beim Vergleich von nicht-infizierten Zellen mit *B. henselae* Wildtyp- oder *B. henselae* $BadA^-$-infizierten Zellen auf RNA-Ebene mittels quantitativer (ADM, HK2) und Real-Time-PCR (VEGF, IL-8) dargestellt werden. Die Infektion mit *B. henselae* Wildtyp führte zu einer 2,9-fachen VEGF-,

bzw. zu einer 4,5-fachen IL-8-Geninduktion. Wurden die Zellen jedoch mit der $BadA^-$-Mutante infiziert, war im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen keine Geninduktion zu erkennen. Vergleicht man weiterhin die mRNA-Level der nicht-infizierten Zellen mit *B. henselae* Wildtyp- oder *B. henselae* $BadA^-$-infizierten Zellen mittels semi-quantitativer PCR (ADM, HK2), kann man ebenfalls eine deutliche HK2- und ADM-Induktion in den *B. henselae* Wildtyp-infizierten Zellen sehen, jedoch nicht in den *B. henselae* $BadA^-$-infizierten Zellen. Die Daten zur Proteinsekretion wurden in Kooperation mit *cand. med*. U. Ehehalt erstellt. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* Wildtyp oder mit *B. henselae* $BadA^-$ infiziert und über 72 h inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA (VEGF, IL-8) und RIA (ADM, IGFBP-3) gemessen. Wie in **Abb. 29** zu sehen ist, führt die Infektion mit *B. henselae* Wildtyp im Gegensatz zur Infektion mit *B. henselae* $BadA^-$ zu einer 3,3-fachen VEGF-, einer 4,1-fachen IL-8-, einer 23,6-fachen ADM- sowie einer 5,1-fachen IGFBP-3-Sekretion. Diese Daten führen zu der Schlussfolgerung, dass die Expression des nicht-fimbriellen Adhäsins BadA für die Induktion des angiogenetischen Genexpressionsmusters sowie für die Zytokinsekretion in HeLa-Zellen entscheidend ist.

3.8. Abhängigkeit der HIF-1-Aktivierung von der Expression von *B. henselae* BadA

Weiterhin wurde die Rolle von *B. henselae* BadA oder von *B. henselae* LPS in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 nach einer Infektion mit *B. henselae* untersucht. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* Wildtyp (MOI 250, 500), *B. henselae* $BadA^-$ und einem „Pilus“-negativen *B. henselae*-Stamm (Pil^-: MOI 250) infiziert. Zur Analyse der Rolle von LPS in der HIF-1-Aktivierung wurden HeLa-Zellen mit 1000 ng/ml *B. henselae* LPS (zur Verfügung gestellt von: Dr. U. Zähringer, Borstel) stimuliert. Bei der Pil^- Variante von *B. henselae*, die durch mehrfaches Passagieren spontan entstanden ist, handelt es sich um eine Variante, deren fehlende BadA-Expression auf eine Deletion, die sich im 5’-Bereich des *badA* Gens und stromaufwärts davon befindet, zurückzuführen ist. Nach der Inkubationsdauer von 6 h wurden die Zellen lysiert und die HIF-1-Aktivierung mittels Western Blot verglichen **(Abb. 18 und 19).**

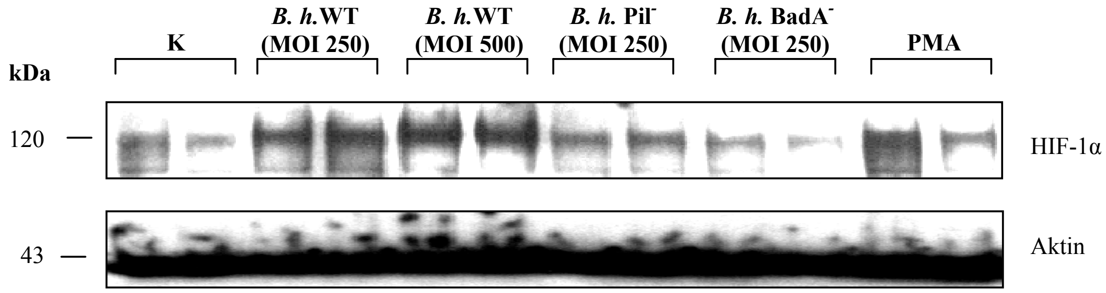


Abb. 18: Rolle der *B. henselae* BadA-Expression auf die HIF-1-Aktivierung nach *B. henselae*-Infektion. Zur Bestimmung der HIF-1-Aktivität mittels Western Blot wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen *B. henselae* Stämmen (*B. h.* Wildtyp, Pil$^-$, BadA$^-$) infiziert und die Zellen nach 6 h lysiert; Positivkontrolle: PMA (25 ng/ml). Um zu gewährleisten, dass sich in allen Gesamtzell-Lysaten gleichviel Protein befindet, wurde als interne Kontrolle ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das *house keeping gene* β-Aktin durchgeführt, das konstitutiv exprimiert wird und ein einheitliches Bandenmuster ergab. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.* WT: Wildtyp (MOI 250, 500), *B. h.* Pil$^-$: *B. henselae* „Pilus“-negative Variante (MOI 250), *B. h.* BadA$^-$: *B. henselae* BadA-negative Mutante (MOI 250).

Wie anhand der HIF-1α-Bandenintensität des Western Blots in Abb. 18 zu sehen ist, führt die Infektion von HeLa-Zellen mit *B. henselae* Wildtyp im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zu einer deutlichen HIF-1-Aktivierung. Im Gegensatz dazu ist beim Vergleich von nicht-infizierten Zellen mit *B. henselae* Pil$^-$- oder *B. henselae* BadA$^-$-infizierten Zellen keine HIF-1-Aktivierung zu erkennen.

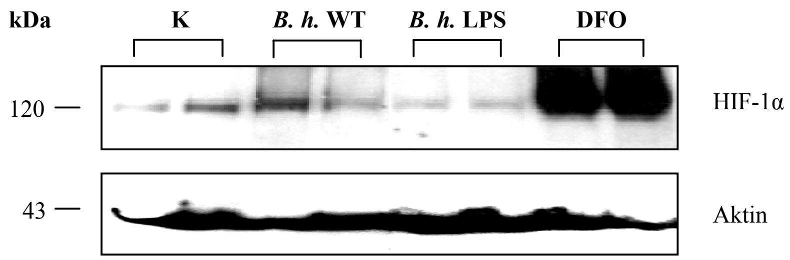


Abb. 19: Rolle von *B. henselae* LPS in der HIF-1-Aktivierung in HeLa-Zellen. Zur Bestimmung der HIF-1α-Aktivität mittels Western Blot wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* Wildtyp (WT: MOI 500) infiziert oder mit *B. henselae* LPS (1000 ng/ml) stimuliert und nach 6 h lysiert. Als Positivkontrolle wurde DFO (2mM) verwendet. Um zu gewährleisten, dass sich in allen Gesamtzell-Lysaten gleichviel Protein befindet, wurde als interne Kontrolle ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das *house keeping gene* β-Aktin durchgeführt, das konstitutiv exprimiert wird und ein einheitliches Bandenmuster lieferte. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: Wildtyp (MOI 500), LPS: *B. henselae* Lipopolysaccharid (1000 ng/ml), DFO: Positiv-Kontrolle.

Wie anhand des Western Blots in Abb. 19 zu sehen ist, führt die Infektion der HeLa-Zellen im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen zu einer deutlichen Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1. Gibt man zu den Zellen jedoch *B. henselae* LPS, ist im

Vergleich zu den Kontroll-Zellen keine Induktion des Transkriptionsfaktors zu erkennen. Somit kann anhand der Ergebnisse beider Versuche (Abb. 18, 19) die Schlussfolgerung gezogen werden, dass *B. henselae* BadA, nicht aber jedoch *B. henselae* LPS, für die HIF-1-Aktivierung entscheidend ist.

3.9. Geninduktion in Endothelzellen nach Infektion mit *B. henselae*

Da Endothelzellen höchstwahrscheinlich die Zielzellen in einer *B. henselae*-Infektion darstellen (Seubert *et al.*, 2002; Dehio, 2001) und eine *B. henselae* Infektion nachfolgend zu deren Aktivierung und Proliferation führt, bestand die nächste Aufgabe darin, zu überprüfen, welches Genmuster in *B. henselae*-infizierten Endothelzellen induziert wird. Wie zuvor bei HeLa-Zellen (siehe 3.1.) wurden Gen-Chip-Experimente mit HUVEC durchgeführt, die mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert und für sechs Stunden inkubiert wurden (Kooperationsprojekt mit *cand. med.* J. Fiebig). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Gen-Chip-Versuchen, die mit HeLa-Zellen durchgeführt wurden, zeigte sich hierbei eine Induktion von insgesamt 75 Genen, von denen 69 herauf- bzw. 6 herabreguliert wurden. Diese Gene spielen bekanntermaßen eine Rolle in Angiogenese (ANGPTL4, IL-8, VEGF, PDGFA, ADM, HSPG2), Apoptose (MCP1, ANGPTL4, FKBP8, TNFAIP3, GADD45B, RTP801, PPP1R15A), Inflammation und Immunität (GM-CSF, MCP-1, GRO1,2,3, SELE, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, COX2, IL-6), Karzinogenese (PHLDA1, BGN, CBFA2T1), Zellmetabolismus und Transport (INSIG1, GLUT3, PLCL2, SLC2A3, SLC7A5, KCNC4, CYP1A1, PTPRO, ATP6V1A) Signaltransduktion (NAB2, ZFP36, NR4A3, NFKBIA, FKBP8, TNFAIP3, GADD45B, DUSP1, BCL3, JUNB, HMGA1, CASKIN2, FOS, DUSP6, EGR1, CNK, IRF1, CEBPB, MAZ, TIEG, JUN, SPRY2, ARHGDIA, JUND, YWHAE, COPEB, ARL7, DUSP5, BMP2, BHLHB2, ID2, ZYX, TACSTD2), Spermatogenese (SPATA2, VCY2IP1) und Streßantwort (DUSP1, HSPA1A, DUSP5, NR4A3). Weiterhin wurde die Induktion von Genen (FLJ23231, FLJ23042, FLJ11336, KIAA0963, C6orf62) aktiviert oder inhibiert, deren Funktion bisher unbekannt ist. Außerdem konnte auch die Induktion zahlreicher Gene, die schon in *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen induziert wurden, in *B. henselae*-infizierten HUVEC-Zellen (VEGF, IL-8, ADM, SLC2A3) beobachtet werden. Tabelle 16 zeigt eine Auflistung der induzierten Gene in *B. henselae*-infizierten HUVEC, die nach ihrer jeweiligen Induktionsstärke geordnet sind **(Tab. 16)**.

Tab. 16: Induzierte Gene in Endothelzellen (HUVEC) 6h nach *B. henselae*-Infektion.

Nr.	Gen (hochregulierte Gene)	Abkürzung	Induktion Array[a] (U133A)	Biologische Funktion[b]	Genbank Zugangszahl
1.	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	GM-CSF,CSF2	18,51	proinflammatorisch	NM_000758
2.	NGFI-A binding protein (EGR1 binding protein 2)	NAB2	13,83	Regulation der Transkription	NM_005967
3.	chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2, MCP1	11,63	proinflammatorisch, anti-apoptotisch	NM_002982
4.	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3, GRO3	9,71	proinflammatorisch, Immunantwort	NM_002090
5.	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1, GRO1	9,58	proinflammatorisch, Immunantwort	NM_001511
6.	zinc finger protein 36	ZFP36	8,34	mRNA Katabolismus	NM_003407
7.	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2, GRO2	7,41	proinflammatorisch, Immunantwort	NM_002089
8.	selectin E	SELE	5,9	Inflammation, vermittelt Zelladhäsion	NM_000450
9.	angiopoietin-like 4	ANGPTL4	5,28	angioproliferativ, anti-apoptotisch	NM_016109
10.	nuclear receptor subfamily 4 group A, member 3	NR4A3	4,89	Regulation der Transkription	NM_006981 NM_173200
11.	interleukin 8	IL-8	4,59	proinflammatorisch, angioproliferativ, Immunantwort	NM_000584
12.	pleckstrin homology-like domain family A, member 1	PHLDA1	4,38	anti-kanzerogen	NM_007350
13.	fragile X mental retardation autosomal homolog 2	FXR2	4,23	fragiles X Syndrom	NM_004860
14.	intracellular adhesion molecule 1	ICAM 1	4,14	Zell-Adhäsion	NM_000201
15.	nuclear factor of kappalight polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NFKBIA	4,11	NF-κB Inhibitor	NM_020529
16.	FK506 binding protein 8	FKBP8	4,0	Signaltransduktion, anti-apoptotisch	NM_012181
17.	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	TNFAIP3	3,92	Regulation der Transkription, anti-apoptotisch	NM_006290
18.	KIAA0963 protein	KIAA0963	3,78	unbekannt	
19.	hypothetical protein FLJ23231	FLJ23231	3,53	unbekannt	NM_025079
20.	solute carrier family 7, member 5	SLC7A5	3,39	Metabolismus, Aminosäuretransport	NM_003486 NM_015923
21.	growth arrest and DNA-damage inducible beta	GADD45B	3,36	proapoptotisch, Signaltransduktion	NM_015675
22.	potassium voltage-gated channel, shaw-related subfamily, member 4	KCNC4	3,25	Metabolismus, Kaliumtransport	NM_004978 NM_153763
23.	dual specificity phosphatase 1	DUSP1	3,2	Stressantwort, Signaltransduktion	NM_004417
24.	spermatogenesis associated 2	SPATA2	3,14	Spermatogenese	NM_006038
25.	hepatitis delta antigen-interacting protein A	DIPA	3,14	Regulation der Hepatitis delta Virus Replikation	NM_005438

Nr.	Gen (hochregulierte Gene)	Abkürzung	Induktion Array[a] (U133A)	Biologische Funktion[b]	Genbank Zugangszahl
26.	biglycan	BGN	3,1	Tumorsupressor	NM_001711
27.	B-cell CLL/lymphoma 3	BCL3	2,95	Regulierung der NF-κB-Aktivität	NM_005178
28.	jun B proto-oncogene	JUNB	2,95	Transkription vom Pol2 Promotor, AP-1 Untereinheit	NM_002229
29.	high mobility group AT-hook 1	HMGA1	2,85	Regulation der Transkription	NM_002131
30.	CASK interacting protein 2	CASKIN2	2,79	Signalmolekül, Adapterprotein	NM_020753
31.	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	2,71	Transkription vom Pol2 Promotor, AP-1 Untereinheit	NM_005252
32.	vascular endothelial growth factor	VEGF	2,69	angioproliferativ	NM_003376
33.	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA	2,69	Wachstumsfaktor	NM_002607 NM_033023
34.	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	CYP1A1	2,51	Metabolismus exogener/endogener Chemikalien, Elektronentransport	NM_000499
35.	dual specificity phosphatase 6	DUSP6	2,48	Signaltransduktion	NM_001946
36.	hypothetical protein FLJ23042	FLJ23042	2,43	unbekannt	NM_002859
37.	heat shock 70kDA protein 1A	HSPA1A	2,43	Stressantwort	NM_005345
38.	early growth response 1	EGR1	2,41	Regulation der Transkription	NM_001964
39.	cytokine-inducible kinase	CNK	2,38	Signaltransduktion	NM_004073
40.	insulin induced gene 1	INSIG1	2,36	Metabolismus, Kontrolle des Cholesterin- und Fettsäurestoffwechsels	NM_005542 NM_198336
41.	interferon regulatory factor 1	IRF1	2,35	Transkription vom Pol2 Promotor, Immunantwort	NM_002198
42.	VCY2 interacting protein 1	VCY2IP1	2,33	Spermatogenese	NM_018174
43.	adrenomedullin	ADM	2,31	angioproliferativ	NM_001124
44.	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	2,3	Transkription vom Pol2 Promotor	NM_005194
45.	solute carrier family 2, member 3	SLC2A3, GLUT3	2,2	Glukosetransport	NM_006931
46.	MYC-associated zinc finger protein	MAZ	2,19	Transkription vom Pol2 Promotor	NM_002383
47.	TGFB inducible early growth response	TIEG	2,16	Herabregulierung der Transkription vom Pol2 Promotor	NM_005655
48.	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	JUN	2,11	Regulation der Transkription	NM_002228
49.	HIF-1 responsive RTP801	RTP801	2,07	anti-apoptotisch	NM_019058
50.	sprouty homolog 2	SPRY2	2,06	Regulation der Signaltransduktion	NM_005842
51.	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDIA	2,03	Rho Protein Signal Transduktion	NM_004309
52.	jun D proto-oncogene	JUND	2,01	Transkription vom Pol2 Promotor	NM_005354
53.	tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	YWHAE	1,99	Signaltransduktion	NM_006761
54.	core promoter element binding protein	COPEB	1,99	Regulation der Transkription	NM_001300
55.	ADP-ribosylation factor-like 7	ARL7	1,99	Signaltransduktion	NM_005737
56.	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2, COX2	1,97	Regulation der Inflammation	NM_000963

Nr.	Gen (hochregulierte Gene)	Abkürzung	Induktion Array[a] (U133A)	Biologische Funktion[b]	Genbank Zugangszahl
57.	vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	1,97	Zelladhäsion	NM_080682
58.	dual specificity phosphatase 5	DUSP5	1,92	Stressantwort, Signaltransduktion	NM_004419
59.	nucleobindin 1	NUCB1	1,92	Ca^{2+} Bindeprotein,	NM_006184
60.	bone morphogenetic protein 2	BMP2	1,91	Wachstumsfaktor, Signaltransduktion	NM_001200
61.	serine proteinase inhibitor, clade B, member 2	SERPINB2	1,89	anti-apoptotisch	NM_002575
62.	basic helix-loop-helix domain containing, classB	BHLHB2	1,87	Regulation der Transkription	NM_003670
63.	interleukin 6	IL-6	1,83	Inflammation, Immunantwort	NM_000600
64.	heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan)	HSPG2	1,83	proangiogenetisch	NM_005529
65.	protein tyrosine phosphatase receptor type, O/// protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	PTPRO	1,8	Elektronentransport	NM_001807
66.	inhibitor of DNA binding 2 dominant negative helix-loop-helix protein	ID2	1,79	Regulation von Transkriptionsfaktoren	NM_002166
67.	zyxin	ZYX	1,79	Zelladhäsion, Signaltransduktion	NM_003461
68.	protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A	PPP1R15A	1,77	Apoptose	NM_014330
69.	tumor-associated calcium signal transducer 2	TACSTD2	1,74	Signaltransduktion	NM_002353

Nr.	Gen (herabregulierte Gene)	Abkürzung	Induktion Array[a] (U133A)	Biologische Funktion[b]	Genbank Zugangszahl
70.	chromosome 6 open reading frame 62	C6orf62	0,58	unbekannt	unbekannt
71.	thioredoxin interacting protein	TXNIP	0,55	unbekannt	NM_006472
72.	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to 1; cyclin D-related	CBFA2T1	0,49	Karzinogenese	NM_004349 NM_175634 NM_175635
73.	ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	ATP6V1A	0,41	Protonentransport	NM_001690
74.	phospholipase C-like 2	PLCL2	0,38	Lipidmetabolismus	NM_015184
75.	hypothetical protein FLJ11336	FLJ11336	0,35	unbekannt	NM_018393

[a] Die Analyse von zwei voneinander unabhängigen Datensets wurde auf dem Affymetrix Microarray suite 5.0 und Affymetrix Data Mining Tool 3.0 durchgeführt.
[b] Die biologischen Funktionen wurden der Datenbank *Gene ontology* (http://www.geneontology.org) entnommen.

3.10. Verifikation der Gentranskription *B. henselae*-infizierter Endothelzellen auf mRNA-Ebene

Zunächst wurde die Induktion einiger der auf dem Gen-Chip induzierten Gene verifiziert (VEGF, IL-8, ADM, MCP-1, GM-CSF). Anschließend wurde verglichen, ob einige in Epithelzellen (HeLa) durch *B. henselae* induzierten Gene auch in Endothelzellen (HUVEC) nach einer *B. henselae*-Infektion induziert wurden. Schließlich wurde die Induktion eines endothelzellspezifischen Rezeptors (KDR) durch *B. henselae* überprüft. Zu diesem Zweck wurden HUVEC mit *B. henselae* infiziert und 6 h inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Anhand der jeweiligen cDNA wurde die Geninduktion mittels semi-quantitativer (ADM, KDR, HK2, MCP-1, GM-CSF) und Real-Time-PCR (VEGF, IL-8) bestimmt **(Abb. 20)**.

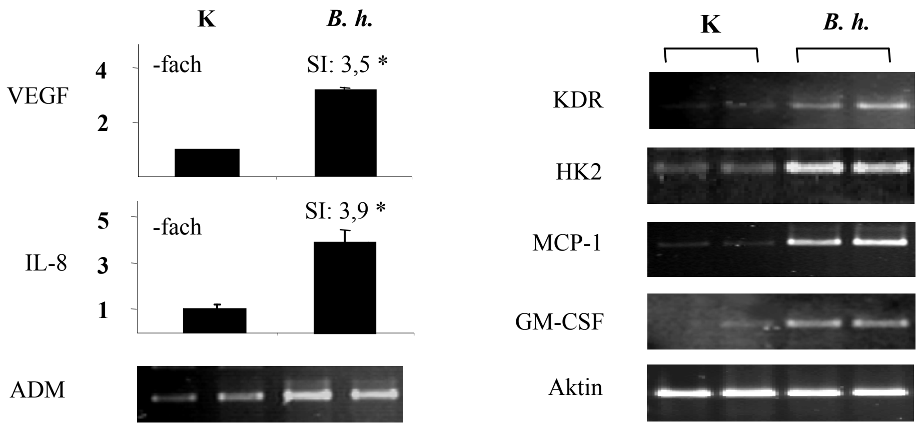


Abb. 20: Geninduktion in Endothelzellen (HUVEC) 6 h nach *B. henselae*-Infektion. HUVEC wurden mit *B. henselae* infiziert und 6 h inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und die jeweilige Geninduktion mittels semi-quantitativer (ADM, KDR, HK2, MCP-1, GM-CSF) und Real-Time-PCR (VEGF, IL-8) bestimmt. Als interne Kontrolle für die Real-Time-PCR wurde das *house keeping gene* β_2-Mikroglobulin verwendet. Um zu gewährleisten, dass jede Probe gleichviel cDNA enthält wurde für die semi-quantitative PCR als interne Kontrolle eine PCR des *house keeping genes* β-Aktin durchgeführt, das in den Zellen konstitutiv induziert wird und eine Bandenintensität gleicher Stärke lieferte. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, SI: Stimulationsindex, *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0{,}05$) im Vergleich zur Negativkontrolle.

Wie in Abb. 20 zu sehen ist, konnte die Induktion der auf dem Gen-Chip induzierten Gene verifiziert werden. Bei dem Vergleich der zuvor über Real-Time-PCR bestimmten Geninduktion zwischen nicht-infizierten und *B. henselae*-infizierten HUVECs, ist nach 6 h eine 3,5-fache VEGF- sowie eine 3,9-fache IL-8-Geninduktion zu beobachten. Mittels semi-quantitativer PCR konnte ebenfalls die Induktion von ADM, MCP-1 und GM-CSF bestätigt

werden, wie die stärkere Bandenintensität bei *B. henselae*-infizierten Zellen zeigt. Weiterhin konnte die Induktion des endothelzellspezifischen Rezeptors KDR, sowie des Schlüsselenzyms der Glykolyse (HK2) nach *B. henselae*-Infektion dargestellt werden. Auffallend war, dass HK2 bereits im Epithelzell-Modell (HeLa) nach *B. henselae*-Infektion induziert wurde. Diese Geninduktion war jedoch aus den HUVEC Gen-Chip-Analysen nicht erkennbar. Durch die Verifikation der Geninduktion anhand von RT- und quantitativer PCR in *B. henselae*-infizierten HUVEC-Zellen, konnte somit die Richtigkeit der Gen-Chip-Daten weitgehend bestätigt werden. Die zusätzliche Induktion der HK2-mRNA, die schon im HeLa-Array (vgl. 3.1.) induziert wurde und der KDR-mRNA sprechen allerdings dafür, dass nicht alle Gene auf dem hier verwendeten Gen-Chip erfasst wurden. Somit konnte deren Geninduktion mittels Gen-Chip nicht bestimmt werden. Zusammenfassend ist zu sagen, dass im Vergleich zum HeLa-Gen-Chip auf dem HUVEC-Gen-Chip zwar ein ähnliches Genexpressionsmuster nach einer *B. henselae*-Infektion induziert wird, zusätzlich aber noch zahlreiche proinflammatorische Gene (GM-CSF, MCP-1, IL-6, SELE) induziert werden.

3.11. Analyse der Genexpression *B. henselae*-infizierter Endothelzellen auf Proteinebene

In einem nächsten Schritt sollte die Genexpression der induzierten Gene in Endothelzellen auf Proteinebene untersucht werden. Da VEGF als wichtigster vaskuloproliferativer Faktor gilt und IL-8 vaskuloproliferative sowie proinflammatorische Eigenschaften besitzt, wurde exemplarisch die Zytokin-Sekretion dieser zwei induzierten Gene mittels ELISA analysiert. Dazu wurden Endothelzellen (HUVEC) mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert und der Überstand nach 72 h abgenommen (**Abb. 21**).

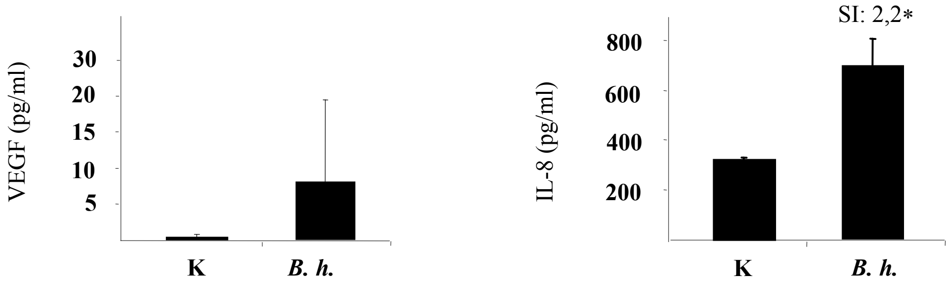


Abb. 21: Zytokin-Sekretion in HUVEC 6h nach *B. henselae*-Infektion. Messung der Zytokin-Konzentration mittels ELISA (VEGF, IL-8). HUVEC wurden mit *B. henselae* Wildtyp (MOI: 500) infiziert und die Zellkulturüberstände 72 h nach Infektion abgenommen. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, SI: Stimulationsindex, ∗: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle.

Wie der Vergleich von nicht-infizierten mit *B. henselae*-infizierten Zellen in Abb. 21 zeigt, sekretieren HUVEC im geringen Maße den vaskuloproliferativen Wachstumsfaktor VEGF (8 +/- 11,3 pg/ml) nach einer *B. henselae*-Infektion. Die IL-8-Sekretion in HUVEC zeigt nach einer *B. henselae*-Infektion einen Stimulationsindex von 2,2. Anhand der Versuche zur Zytokin-Sekretion in HUVECs konnte ebenfalls die Induktion und Translation eines angiogenetischen Genmusters nach einer *B. henselae*-Infektion von Endothelzellen bestätigt werden.

3.12. HIF-1/-2-Aktivierung in Endothelzellen nach *B. henselae*-Infektion

Da von einigen der induzierten und verifizierten Gene (ADM, VEGF, HK2, GLUT-3, RTP801) bekannt ist, HIF-1-reguliert zu sein (Semenza, 2001a; Shoshani *et al.*, 2002), wurde die Aktivierung von HIF-Transkriptionsfaktoren in Endothelzellen (HUVEC) nach *B. henselae*-Infektion untersucht. Dazu wurden HUVEC mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert und die Zellen nach 6 h lysiert. Die Aktivierung der HIF-Transkriptionsfaktoren wurde mittels Western Blot bestimmt **(Abb. 22).**

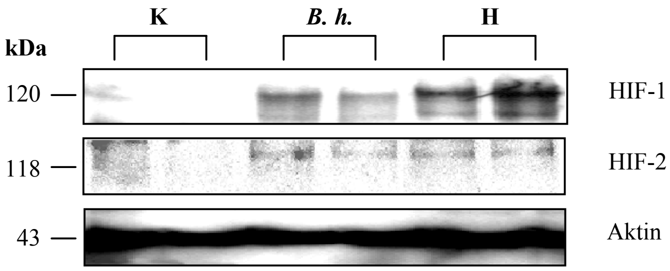


Abb. 22: Aktivierung von HIF-1 und HIF-2 in HUVEC 6 h nach *B. henselae*-Infektion. HUVEC wurden mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert und die Zellen nach 6 h lysiert. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und HIF-2 wurde mittels Western Blot (HIF-1α- und HIF-2α-spezifische Antikörper; 1:1000) bestimmt. Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren. Um zu gewährleisten, dass sich in allen Gesamtzell-Lysaten gleichviel Protein befindet, wurde als interne Kontrolle ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das *house keeping gene* β-Aktin durchgeführt, das konstitutiv exprimiert wird und ein einheitliches Bandenmuster hervorruft. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae* Wildtyp (MOI 500), H: Hyopxie.

Vergleicht man 6 h nach *B. henselae*-Infektion die HIF-1- und HIF-2-Aktivierung zwischen nicht-infizierten und infizierten HUVEC, ist nach einer *B. henselae*-Infektion anhand der Bandenmuster in Abb. 22 eine deutliche Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren zu erkennen. Als Positivkontrolle wurden die Zellen unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Die Aktivierung von HIF-1 und HIF-2 in HUVECs führt zu der Schlussfolgerung, dass eine

Infektion von Endothelzellen, den angenommenen Zielzellen von *B. henselae* ebenfalls in einer Induktion eines angiogenetischen Genmusters resultiert (Seubert *et al.*, 2002; Dehio, 2001), wie *in vitro* im HeLa-Modell gezeigt werden konnte. Für eine HIF-2-Aktivierung nach einer *B. henselae*-Infektion spricht außerdem die Tatsache, dass schon auf mRNA-Ebene nach einer *B. henselae*-Infektion die Geninduktion des endothelzellspezifischen Rezeptors KDR bestätigt werden konnte, welcher HIF-2-reguliert ist (Elvert *et al.*, 2003).

3.13. VEGF-Geninduktion, -sekretion, HIF-1-Aktivierung und Zellviabilität nach Infektion mit *B. henselae*

Nachdem auf mRNA- und auf Proteinebene die VEGF-Induktion sowie -Sekretion nach einer *B. henselae*-Infektion nachgewiesen werden konnte und gezeigt wurde, dass die Genaktivierung durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert wird, stellte sich die Frage, ob die VEGF-Geninduktion ein *Bartonella*-spezifisches Phänomen ist oder ob generell bei Bakterieninfektionen VEGF-mRNA induziert wird. Um dies zu überprüfen, wurden HeLa-Zellen mit *B. henselae* (MOI 250), *Y. enterocolitica* (MOI 20)*, E. coli* (MOI 100*)* und *L. pneumophila* (MOI 100) infiziert und die Zellen nach einer Inkubationszeit von 6 h lysiert. Anschließend wurde die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und die VEGF-Geninduktion mittels Real-Time-PCR quantifiziert **(Abb. 23).**

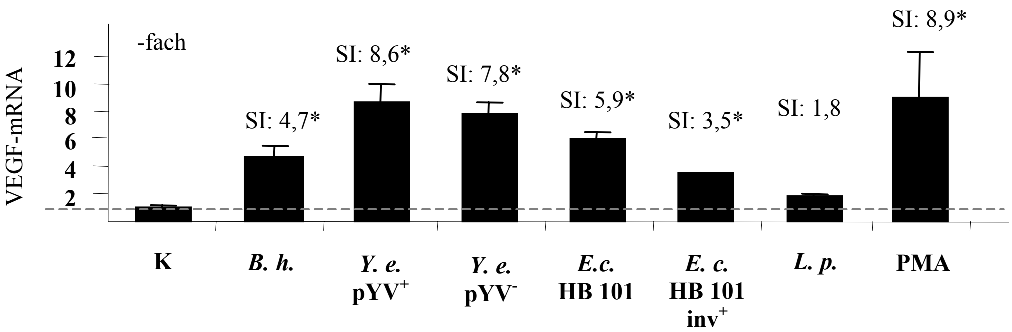


Abb. 23: VEGF-Geninduktion in HeLa-Zellen 6h nach Infektion mit *B. henselae, Y. enterocolitica, E. coli* und *L. pneumophila.* Messung der VEGF-Geninduktion mittels Real-Time-PCR. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250), *Y. enterocolitica* pYV^{+} bzw. pYV^{-} (MOI 20)*, E. coli* HB 101 bzw. HB 101 inv^{+} (MOI 100*)* und *L. pneumophila* (MOI 100) infiziert und 6 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde PMA (25 ng/ml) verwendet. Als interne Kontrolle für die Real-Time-PCR wurde das *house keeping gene* β_2-Mikroglobulin verwendet. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.* : *B. henselae*, *Y. e.* pYV^{+}: *Y. enterocolitica* Wildtyp, *Y. e.* pYV^{-}: *Y. enterocolitica* Mutante (ohne pYV-Plasmid), *E. c.* HB 101: *Escherichia coli* HB 101, *E. c.* HB 101 inv^{+}: *Escherichia coli* HB 101 mit Invasin, *L. p.*: *Legionella pneumophila*, SI: Stimulationsindex, *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Negativkontrolle.

Vergleicht man die VEGF-Geninduktion zwischen nicht-infizierten und infizierten Zellen, ist wie in Abb. 23 dargestellt zu erkennen, dass ausnahmslos alle Bakterien 6 h nach Infektion VEGF-mRNA induzieren. *Y. e.* pYV$^+$ und *Y. e.* pYV$^-$ rufen dabei die höchste Geninduktion (SI: 8,6 bzw. 7,8) hervor, gefolgt von *E. c.* HB 101 (SI: 5,9), *B. henselae* (SI: 4,7) und *E. c.* HB 101 inv$^+$ (SI: 3,5). Die geringste Geninduktion wurde durch *L. pneumophila* hervorgerufen (SI: 1,8). Diese Infektionsversuche legen nahe, dass die durch verschiedene Bakterien ausgelöste VEGF-Induktion auf mRNA-Ebene ein generelles Phänomen zu sein scheint.

Da *B. henselae* über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 eine VEGF-Induktion hervorruft, war als nächstes von Interesse, ob auch die anderen hier schon verwendeten Bakterien die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 verursachen. HeLa-Zellen wurden infiziert und 6 h nach Infektion lysiert. Die HIF-1-Aktivierung wurde mittels Western Blot analysiert. Wie anhand **Abb. 33** (Kooperationsprojekt mit *cand. med.* U. Ehehalt) zu sehen ist, rufen alle Bakterien (außer *L. pneumophila*) eine Aktivierung von HIF-1 hervor. Das Ergebnis von diesem Experiment zeigt, dass die HIF-1-Aktivierung nicht nur auf *B. henselae* beschränkt ist, sondern dass es sich hierbei um eine Reaktion der Wirtszelle auf eine Vielzahl von bakteriellen Erregern handelt.

Nachdem auf mRNA-Ebene eine VEGF-Geninduktion durch verschiedene Bakterien gezeigt wurde, bestand der nächste Schritt darin, zu überprüfen, ob die Sekretion des angioproliferativen Proteins VEGF durch diese Bakterien hervorgerufen wird. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250), *Y. enterocolitica* (MOI 20), *E. coli* (MOI 100) und *L. pneumophila* (MOI 100) infiziert und 72 h inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die VEGF-Sekretion mittels ELISA gemessen. Überraschenderweise zeigte sich, dass nur *B. henselae* in der Lage war die VEGF-Sekretion in den Wirtszellen nach 72 h zu stimulieren. Bei allen anderen Bakterien sank die Sekretion des angioproliferativen Proteins sogar unter den Wert der nicht-infizierten Kontrolle **(Abb. 31,** Kooperationsprojekt mit *cand. med.* U. Ehehalt**)**. Nach der Messung der VEGF-Sekretion wurde mit denselben Überständen die IL-8-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass außer *B. henselae* noch *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und *E. coli* HB 101 inv$^+$ in der Lage waren, 72 h nach Infektion in den Wirtszellen die IL-8-Sekretion zu stimulieren **(Abb. 32,** Kooperationsprojekt mit *cand. med.* U. Ehehalt**)**. Mit diesen Daten konnten Ergebnisse, die für *Y. enterocolitica* pYV$^-$ bereits bekannt waren, bestätigt und damit das Infektionsmodell validiert werden (Schulte *et al.*, 1996). Die Analyse der VEGF- bzw. IL-8-Sekretion zwischen *B. henselae* und

den anderen Bakterien lässt darauf schließen, dass die VEGF-Sekretion kein generelles Phänomen ist und dass nur *B. henselae* in der Lage ist, die Sekretion beider angioproliferativ wirksamen Zytokine zu induzieren.

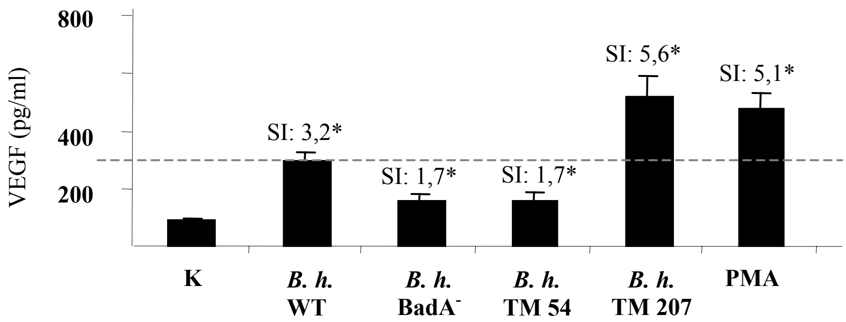
Da von *B. henselae* außerdem bekannt ist, Apoptose in Wirtszellen zu inhibieren (Schmid *et al.*, 2004; Kirby and Nekorchuk, 2002; Kempf *et al.*, 2005b), wurden anschließend Versuche durchgeführt, bei denen die Viabilität der Wirtszellen anhand von Giemsa- und MTS-Assay 12, 24 und 48 h nach Infektion mit verschiedenen Bakterien verglichen wurde. Dabei zeigte sich, dass die Viabilität aller, mit *Y. enterocolitica*, *E. coli* oder *L. pneumophila* infizierten Wirtszellen, 24 h bzw. 48 h nach Infektion, verglichen mit der Viabilität nicht-infizierter Zellen, stark verringert war **(Abb. 34,** Kooperationsprojekt mit *cand. med.* J. Fiebig**)**. Im Gegensatz dazu blieb die Viabilität *B. henselae*-infizierter Zellen unbeeinflusst. Somit resultiert der Vergleich der Zellviabilität Bakterien-infizierter Wirtszellen in der Schlussfolgerung, dass nur *B. henselae* in der Lage ist, die Viabilität der Wirtszellen nicht zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu führt die Infektion mit den hier verwendeten Kontrollbakterien zu einem deutlichen Absinken der Viabilität der infizierten Wirtszellen. Interessanterweise war nach Infektion mit den hier verwendeten Bakterien eine Induktion der VEGF-mRNA sowie eine HIF-1-Aktivierung, jedoch keine Sekretion des proangiogenetischen Zytokins VEGF zu beobachten. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Induktion des Wirtszelltodes durch die hier verwendeten Bakterien für die Unterbrechung des angiogenetischen Programms verantwortlich ist.

3.14. Analyse der VEGF-Sekretion in Wirtszellen nach Infektion mit verschiedenen *B. henselae*-Transposonmutanten

In einem weiteren Projekt dieser Doktorarbeit wurden Wirtszellen mit verschiedenen *B. henselae*-Transposonmutanten (Riess *et al.*, 2003) infiziert und deren VEGF-Sekretion mit der VEGF-Konzentration von *B. henselae* Wildtyp-infizierter Wirtszellen verglichen. Ziel dieser Untersuchung war es, weitere Gene neben BadA zu finden, die an der Induktion der VEGF-Sekretion beteiligt sind. Als interne Kontrolle wurde eine Transposonmutante, die seit kurzem als $BadA^-$-Mutante bekannt ist und nur noch eine stark verminderte VEGF-Sekretion induziert, verwendet (Riess *et al.*, 2004). Da diese Transposons zufällig in das Bakteriengenom eingebaut werden und somit einzelne Gene ausgeschaltet werden können, besteht die Möglichkeit, nach weiteren bakteriellen Genen zu suchen, die in der Regulierung der VEGF-Expression und damit in der pathologischen Angiogenese eine Rolle spielen. Diese

Versuche wurden parallel mit Epithel- (HeLa) und Endothelzellen (Ea.hy 926) durchgeführt, um zelltypabhängige Effekte auszuschließen. Für diese Analyse wurden zunächst 300 Transposonmutanten auf ihre VEGF-Sekretion mittels ELISA überprüft. Aufgrund der großen Anzahl der Transposonmutanten wurde der Versuchsansatz von einem 24-Well-Format auf ein 96-Well-Format umgestellt. Dazu wurden HeLa bzw. Ea.Hy. 926 mit *B. henselae* Wildtyp oder den Transposonmutanten (MOI 50, 500, 5000) infiziert und unterschiedlich lang (24 h, 72 h) inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die VEGF-Sekretion mittels ELISA analysiert. Die besten Messwerte ergaben sich bei einer Infektion der Zellen mit einer MOI 500 sowie nach einer Inkubationszeit von 24 h (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde dieses Format für zukünftige Infektionen beibehalten. Da zwischen beiden Zelllinien kein Unterschied in der VEGF-Sekretion zu beobachten war, ist in **Abb. 24** die VEGF-Sekretion von *B. henselae* WT- bzw. *B. henselae*-Transposonmutanten- (54, 207) infizierter HeLa-Zellen dargestellt.

Analyse der VEGF-Sekretion 24.1:



Analyse der VEGF-Sekretion 24.2:

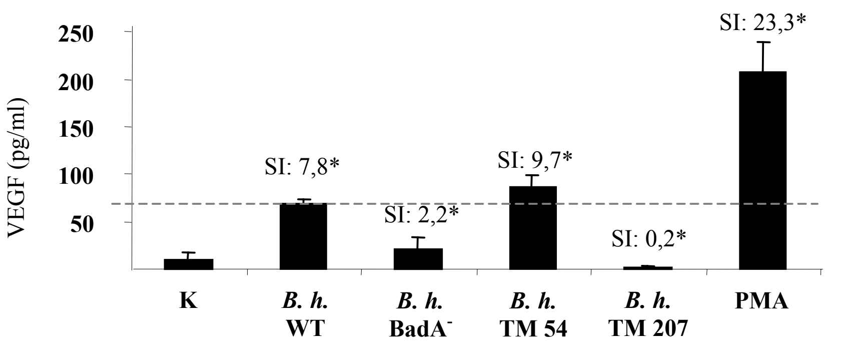


Abb. 24: VEGF-Sekretion in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae*-Transposonmutanten. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* Wildtyp bzw. mit *B. henselae*-Transposonmutanten (alle MOI 500) infiziert und über 24 h inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die sekretierte VEGF-Konzentration mittels ELISA bestimmt. PMA: Positivkontrolle (25 ng/ml), K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.* WT: *B. henselae* Wildtyp, *B. h.* BadA$^-$: *B. henselae* BadA$^-$, *B. h.* TM: Transposonmutanten 54 bzw. 207, SI: Stimulationsindex, *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0{,}05$) im Vergleich zur Negativkontrolle.

Unter den 300 überprüften Transposonmutanten fanden sich in einer ersten Untersuchung (Abb. 24.1) zwei Transposonmutanten, die in mehrfachen Wiederholungen in beiden Zelllinien gegenüber dem Wildtyp (*B. h.* WT, SI: 3,2) eine verringerte (*B. h.* TM 54, SI: 1,7) bzw. erhöhte VEGF-Sekretion (*B. h.* TM 207, SI: 5,6) zeigten. Eine zweite Messung von *B. henselae* TM 54- und 207-infizierten Zellen führte jedoch zu einer veränderten VEGF-Sekretion (Abb. 24.2.). *B. h.* TM 54-infizierte Wirtszellen zeigten, im Vergleich zu *B. h.* WT-infizierten Zellen, eine erhöhte (SI: 9,7), *B. h.* TM 207-infizierte Wirtszellen eine verringerte (SI: 0,2) VEGF-Sekretion.

In einem nächsten Schritt wurden die Mutanten chromosomal sequenziert, um herauszufinden, in welches Gen das Transposon inseriert ist. Die chromosomale DNA wurde nach Protokoll (Qiagen Genomic DNA Handbook, vgl. Kapitel 2.2.2.) isoliert und die Insertionsstelle durch chromosomale Sequenzierung aus dem Transposon in 5'- und 3'-Richtung ermittelt (GATC Biotech AG, Konstanz). Als Sequenzierprimer wurden <KAN-2>FR-1 und <KAN-2>PR-1 Primer verwendet (vgl. Kapitel 2.1.8.). Mit den DNA-Sequenzen wurde mittels BlastX (www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST) nach der Position der Transposon-Insertion gesucht.

Der Vergleich der DNA-Sequenzen mit der Datenbank zeigte, dass es sich bei der Transposonmutante 54 um ein Gen handelt, das eine 92 %ige Homologie zu der ATP-bindenden Untereinheit clpB, einer ATP-abhängigen clp Protease von *B. henselae* Houston-I, besitzt. Diese ATP-abhängigen Clp Proteasen zählen zu den Stressproteinen, die eine wichtige Rolle in der Virulenz verschiedener Pathogene spielen. ClpB zählt zu den Hitzeschockproteinen, induziert z. B. Thermotoleranz und ermöglicht die intrazelluläre Vermehrung von *S. aureus* bei hohen Temperaturen (Frees *et al.*, 2004). Für *L. monozytogenes* ist ebenfalls bekannt, dass ClpB eine Rolle in der Entwicklung von Thermotoleranz und Virulenz spielt (Chastanet *et al.*, 2004). Für *E. coli* gibt es Daten, die zeigen, dass ClpB als molekulares Chaperon fungiert, das die ATP-abhängige Rückfaltung oder die Zusammenlagerung ungefalteter Proteine von hitzegestressten Zellen katalysiert (Woo *et al.*, 1992). Bei der Transposonmutante 207 handelt es sich um ein Gen, mit einer 98 %igen Homologie zum Gen BH05460 von *B. henselae* Houston-I. Es kodiert für ein hypothetisches Protein, das Homologien zur CHI Untereinheit einer DNA Polymerase III aufweist. Die Ergebnisse sind in **Tab. 17** aufgelistet.

Zusammenfassend muss hierzu festgestellt werden, dass die Varianz in diesem etablierten System zu hoch ist, um im Pool der 300 Mutanten weitere interessante Kandidatengene zu

finden, die in der Regulierung der VEGF-Expression eine Rolle spielen. Um zu überprüfen, ob die hier entdeckten Gene einen direkten Effekt auf die VEGF-Sekretion vermitteln oder ob es sich um polare Effekte auf nachfolgende Gene handelt, die durch Insertion des Transposons hervorgerufen werden, versuchte man, die Transposonmutanten zu komplementieren. Um die gesamte Gensequenz des Gens mit der Transposon-Insertion zu erhalten, wurde mittels Primerwalking weitersequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz). Leider lieferten die folgenden chromosomalen Sequenzierungen beider Mutanten nur schlechte und unzureichende DNA-Sequenzen. Da die Houston-I Genom-Sequenz zu diesem Zeitpunkt noch nicht veröffentlicht war, konnten diese Mutanten genetisch nicht weiter analysiert werden.

Tab. 17: Nukleotidsequenzen mit der Transposon-Insertionsstelle der Transposon-Mutanten mit erhöhter bzw. verminderter Fähigkeit zur Induktion der VEGF-Sekretion.

Mutante	Nukleotidsequenz 5'-3' (Die Insertion des Transposons EZ::TN<KAN-2>Tnp ist durch <Tn> angegeben)	Insertionsstelle
54	TTTTGATCTTTTTTCTTCTTTACTCGCGTGATCCCCCTCTTGCTATGGGGCGTGTGAGAACCCATATTTGTTTTAGCACTACAGCTATTTTCATGCTG CCTCGTTCGCGGTGTTTTGCGGGGGTAAGGCCTATCCTTGCGGGTGCTTTGGGGAGTTAAAGTGCAGCGGTAGTGCAAGAAAGGAAAAAAAATGAATC TGGAAAAATATAGCGAACGGTTGCAAGGCTTTTTACAAACAGCACAAAATAAGGCTCTCTCTTCTGATCATCAACAATTTATGCCGGAACATTTCCTC AAAGTGTTGTTAGAGGATTCTCAAGGATTGGCCACATCATTGATCCAAAAAGCTGGCGGTGATCTCTCTCTTATTCAAAAAGCGCTCGAAGAAGCGCT CGATGCTTTGCCAAAAGTGCAAGGCGGAAATGGGCAGCTTTATCTCTCGCAGCCGTTGGCAAAAGTCTTCACTCTAGCAGAAGATCTCGCACATAAAG CTGGGGATCAGTTTGTAAC**<Tn>**GTTTGTAACCGTCGAGCGTGTGCTGCAAGCGCTTATATGGAGAAAACTGCAAAAACAGCCGTATTTTACAAAAGC AGGTCTGACTCCGCAAGCACTCAATCAAGCCATTAACGCTTTGCGTAAAGGAAAAACGGCTACAAGTCCTCATGCCGAAAGCCAATATGATGCTTTGC AAAAATATGCATGCGATCTTACAAAAGATGCACGGGAAGGAAAACTTGATCCTGTTATTGGACGTGAAGAAGAAATTTGCC	in einem Gen mit Homologie zu einer *ATP-dependent clp protease*, *ATP-binding subunit clpB* von *B. henselae* Houston-I (92 % identisch).
207	GANTAAANATNTNAGNNGANNGTTNGNGATTGGNGNGATAGTGGGAGGNNAAAGGNNNNGNNNAGNGANANNNNANGAAATNAAGGNAGAGGGNGNGG TGNAAAGGGNGGAANGAGNAGNAGGGGNTGGGGGGGNAGANANGGNGTNAGGNGGNGNGGGGNNGGNGGNGTGNGAGGNGGAAGGTAAAAGNGCGCAG CAAGAGGNAGGCANGTGTNCGCAANTGCGAGNNAAGGGTCATTTTATCTCANAACATTTTCTTTTGTATGAGGGATAGAGAAGTTTCTTCAAAAAGAT ATTGGTTTTTTTATAAAGAATGATAAGGGCGAAGAGGGTGGATATTCTTTTCTATCATTTGACGCAGTCAACGTTGGAAGATATTTTGCCAACACTTG TAGAACGTGCACTAGGACGTTTTAGTAGGGTAACAATACAATGTGTGAGTAAAGAACGACGTGATGCTATAGATACACGTTTATGGGTTTATGCTGAT GAAGCATTTATTGGACACGGAACTGAGTGTGATCAATATCCAAATTTTCAGCCTGTATTTCTTACTACAGGGCAGGAGAATCCGAATGATTCAAAGAT ACGTTTTCTCATAGAGGGAGCGATTTGTTCGGATATaAATGC**<Tn>**TATAAATGCTTATCAACGACTTGTAGTACTCTTTGATGGTCAAAGTGATGAA CAGTTGCACATTGTTCGCGCACAGTGGAAAAAATATAAAATGGAAAATCATAATTTGACTTATTGGCAGCAGACTGAAGATCGCTCTTGGAAAAAACA AGTTTGATGCATGTAACATCTATTATTTTGACTTTTATAGGACTGGTAGGAATAATCAATCAGGCAATTTTATTGCAGAAGGATCAGAAGGAGGATAT TGGGTTTTTATTGTGATGTTTCTTCTGGGAGTAATAAAGATGTGTTCTACAATTGTTCATAATTATCTTTCTGACAAAATATTCAAACGGAGTGATAA TGATCATTGATCGAATTTTGCTTATTTTATGGGCTGTAATGTCNGCTTNNTTTNGCNNTTCATGGCCGGGGACNACACNTNNCNCNCNCNATCCNTCT ANTGCNNANATNNCCNNNCCNCNNCCCNTNTCNCNCCCCTCNCNCCNCCCCNNCNCNCTNCCCCCCCCNNNCNCCCTNNNCTTNCTNCCCNCCCNNTN CNNNCCNCCCNCNCCCNCCNCNCNCCNCCCCCCCTCCCCTCTCNTNNC	in einem Gen mit Homologie zu BH05460 von *B. henselae* Houston-I (98 % identisch). Das von diesem Gen kodierte hypothetische Protein weist Homologien zu einer DNA Polymerase III, CHI Untereinheit auf.

4. Diskussion

Mitglieder der Gattung *Bartonella* spp. sind bekannt als Verursacher humaner Erkrankungen wie z. B. dem 5-Tage-Fieber, der bazillären Angiomatose (BA), der bazillären Peliosis hepatis (BPH) und der Katzenkratzkrankheit (Jacomo *et al.*, 2002). Die durch die Infektion hervorgerufenen Krankheitsbilder entstehen durch Assoziation der Erreger mit Endothelzellen sowie durch intraerythrozytische Bakteriämien (Chomel *et al.*, 2003; Dehio, 2001). Es wird vermutet, dass bei einer Infektion *Bartonella* spp. das Endothel kolonisiert, was zu einer nachfolgenden Aktivierung der Endothelzellen führt und zur Pathogenese von *Bartonella*-verursachten Erkrankungen beiträgt. Der Aktivierung folgt eine erhöhte Proliferation der Endothelzellen, die die Bildung vaskuloproliferativer Läsionen wahrscheinlich begünstigt (Fuhrmann *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 2004).

Neoangiogenese ist bei verschiedenen Erkrankungen zu beobachten, wie z. B. in der Tumorentstehung, Metastasierung oder bei inflammatorischen Erkrankungen. Ebenso ist bekannt, dass die Bildung neuer Gefäße durch virale Erkrankungen, wie z. B. HHV-8, das die Entstehung des Kaposi Sarkoms verursacht, ausgelöst wird (Carmeliet and Jain, 2000). Unter den bakteriellen Erregern ist die Kapazität zur Auslösung von Gefäßproliferationen lediglich für Mitglieder der Gattung *Bartonella* spp. zu beobachten (Garcia *et al.*, 1990; Köhler *et al.*, 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Induktion der Endothelzellproliferation bzw. die Mechanismen der Angiogenese im Krankheitsbild der BA auf molekularer Ebene untersucht werden. Hierzu wurden Untersuchungen über *B. henselae*-induzierte proangiogenetisch wirksame Zytokine, Transkriptionsfaktoranalysen und deren Regulierung durchgeführt und die Abhängigkeit der Infektion von BadA untersucht. Weiterhin wurden die durch verschiedene Kontrollbakterien ausgelösten Wirtszellantworten miteinander verglichen. Dabei wurde die Induktion des proangiogenetischen Zytokins VEGF und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 untersucht. Schließlich sollte über die Analyse der proangiogenetischen Fähigkeit von bereits existierenden *B. henselae*-Transposonmutanten nach weiteren bakteriellen Genen gesucht werden, die Auswirkungen auf die Regulierung der VEGF-Expression haben, da VEGF als wichtigster Wachstumsfaktor für Endothelzellen bekannt ist (Leung *et al.*, 1989).

4.1. Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort nach *B. henselae*-Infektion

4.1.1. Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort im HeLa-Zellkulturmodell

Neben HHV-8, das die vaskuloproliferative Erkrankung „Kaposi Sarkom“ (KS) hervorruft (Chang *et al.*, 1994; Flore *et al.*, 1998), konnte bisher auf bakterieller Seite nur für Mitglieder der Gattung *Bartonella* spp. gezeigt werden, Verursacher vaskuloproliferativer Störungen, wie der BA bzw. der BPH zu sein (Relman *et al.*, 1991; Jacomo *et al.*, 2002). Dass *B. henselae* zumindest *in vitro* die Vaskuloproliferation von Endothelzellen durch Induktion des angiogenetischen Faktors VEGF triggert, wurde in Versuchen gezeigt, in denen das Proliferationsverhalten nicht-infizierter Endothelzellen (HUVEC) untersucht wurde. Dabei wurden HUVEC entweder mit rekombinantem humanen VEGF oder mit konditioniertem Medium von *B. henselae*-infizierten Zellkulturen behandelt (Kempf *et al.*, 2001). In beiden Fällen war eine erhöhte Proliferation der HUVEC zu beobachten. Weiterhin führte die Zugabe von anti-VEGF-Antikörpern zum konditionierten Medium zu einer Halbierung der Proliferationsrate der Endothelzellen. Daraus resultierte die Hypothese, dass nicht nur VEGF, sondern ein „Cocktail“ verschiedener angiogenetischer Faktoren an der Entstehung *B. henselae*-induzierter, vaskuloproliferativer Erkrankungen beteiligt zu sein scheint (Kempf *et al.*, 2001).
Die Beteiligung eines angiogenetisch wirksamen „Cocktails“ an der Proliferation von Endothelzellen wird auch durch Daten aus klinischen Studien bestätigt, die zeigten, dass der alleinige Einsatz von VEGF zur Wachstumsstimulierung von Kollateralgefäßen bei Patienten mit ischämischen Erkrankungen der Koronarien sowie der Gefäße der Extremitäten nicht die erwünschte Wirkung erzielte (Ferrara and Alitalo, 1999; Henry *et al.*, 2003). Gestützt wird diese Hypothese auch dadurch, dass dem angiogenetischen Wachstumsfaktor VEGF ebenfalls eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Kaposi Sarkoms zukommt (Masood *et al.*, 1997). KS-Tumore zeigen, wie bei der durch *B. henselae* hervorgerufenen BA, eine Neubildung vaskulärer Strukturen durch Proliferation von Endothel- und Tumorzellen sowie eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. Außerdem scheinen KS-Zellen weitere angiogenetische Faktoren zu sekretieren, die eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Progression von KS eine Rolle spielen (Nakamura *et al.*, 1988; Salahuddin *et al.*, 1988).

Aus dieser Überlegung heraus wurde zuerst anhand eines etablierten Modells mit HeLa-Zellen mittels Gen-Chip-Experimenten das Genexpressionsmuster zwischen nicht-infizierten und *B. henselae*-infizierten Zellen verglichen **(Tab. 15)**. Überraschenderweise wurden auf den Gen-Chips dabei nur 20 signifikant hochregulierte Gene gefunden, von denen vierzehn bekanntermaßen durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert werden (Semenza, 2001a). Interessanterweise wurden jedoch außer IL-8 keine weiteren Gene induziert, die in inflammatorischen Reaktionen oder in der angeborenen Immunität eine Rolle spielen. Die Induktion einer Vielzahl dieser Gene (VEGF, STC-2, ADM, IGFBP-3, HK-2, IL-8, CCNG2, NDRG1, KIAA0742 und FLJ22182fis) wurde mittels quantitativer und semi-quantitativer RT-PCR verifiziert **(Abb. 10)**. Die Zunahme der Proteinsekretion von VEGF, IL-8, ADM und IGFBP-3 wurde mittels ELISA, die HK2- und STC2-Expression mittels Western Blot bestimmt **(Abb. 11)**. Damit konnte die auf dem Gen-Chip erkennbare Geninduktion transkriptionell und translationell bestätigt werden.

Neben VEGF, der als wichtigster auslösender Faktor angiogenetischer Prozesse gilt (Carmeliet, 2003), sind bekannterweise noch weitere Zytokine an der Angiogenese beteiligt. Eines der entsprechenden und auf dem Gen-Chip-Experiment induzierten Zytokine ist das vasodilatorisch wirkende Adrenomedullin (Kitamura *et al.*, 1993), das eine Rolle in der Tumorangiogenese und in der Gefäßentwicklung spielt (Caron and Smithies, 2001;Öhler *et al.*, 2002). Eine Rolle in der Angiogenese wird ebenfalls für IGFBP-3 vermutet, da das Protein im Endothel des humanen *Corpus luteum* und in Endothelzellen, in einem murinen Brustkrebsmodell, nachgewiesen werden konnte (Schmid *et al.*, 2003). Außerdem wurde eine erhöhte Expression von IGFBP-3 unter Hypoxie beschrieben (Popovici *et al.*, 2001). Ein weiteres Gen, dem angiogenetische Eigenschaften zugesprochen werden, ist STC2. Das Protein zeigt 34 % Homologie zu STC1 (Chang and Reddel, 1998). Für STC1 ist bekannt, eine regulatorische Rolle in der Angiogenese zu spielen, da eine erhöhte Bildung des Proteins in einem *in vitro* Angiogenesemodell und in pathologischen Angiogeneseprozessen, wie z. B. in der Tumorvaskularisierung, nachgewiesen werden konnte (Zlot *et al.*, 2003). Außerdem ist STC1 an der Regulation des zellulären Metabolismus beteiligt und scheint eine Rolle in den metabolischen Anforderungen von Endothelzellen und anderen Zellen zu spielen, die an der Bildung neuer Blutgefäße beteiligt sind (Filvaroff *et al.*, 2002; McCudden *et al.*, 2002). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass STC2 durch Hypoxie bzw. HIF-1 induziert (Leonard *et al.*, 2003) und im Rattenmodell in kortikalen Neuronen nach zerebraler Ischämie verstärkt exprimiert wird (Ito *et al.*, 2004). STC2 scheint ebenfalls eine Rolle in der Karzinogenese zu

spielen, da eine erhöhte STC2 Geninduktion in Brusttumoren nachgewiesen werden konnte (Charpentier *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2003). IL-8, das proinflammatorische Eigenschaften und die Fähigkeit zur Aktivierung von Chemotaxis und Proliferation von Endothelzellen besitzt, hat ebenfalls eine starke angiogenetische Wirkung. Zudem wird IL-8 von einer Vielzahl von Tumoren sezerniert (Desbaillets *et al.*, 1997; Koch *et al.*, 1992).

Außer den proangiogenetischen Faktoren wurden auch eine Reihe von Genen durch *B. henselae* induziert, die im Energiemetabolismus oder in der Signaltransduktion der Wirtszelle eine Rolle spielen. Eine verstärkte Produktion des Enzyms Hexokinase 2, das das Schlüsselenzym der Glykolyse darstellt, ist in schnell wachsenden Tumoren bekannt (Arora *et al.*, 1990). Kürzlich wurde gezeigt, dass in Leberkarzinomzellen HK2 durch Hypoxie bzw. durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 induziert wird und der Hauptenergielieferant für das maligne Tumorwachstum mittels Glykolyse unter Hypoxiebedingung zu sein scheint (Yasuda *et al.*, 2004; Mathupala *et al.*, 2001).
Von NDRG1 ist bekannt, dass die Transkription HIF-1-abhängig durch Hypoxie induziert wird und auf bisher unbekanntem Wege wahrscheinlich Schutz vor ischämscher Zellschädigung bietet (Lachat *et al.*, 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass NDRG1 im Vergleich zu normalem Gewebe in Karzinomen überexprimiert wird und deshalb als Kandidat für einen Tumormarker in Frage kommt (Cangul, 2004). Allerdings ist die exakte Funktion von NDRG1 in der Tumorgenese unbekannt. Es wird jedoch angenommen, dass NDRG1 die eigenständige Etablierung von Tumorzellen fördert und das Überleben und Wachstum von Tumorzellen unter unvorteilhaften Bedingungen begünstigt (Cangul, 2004).
Bei einem weiteren nach einer *B. henselae*-Infektion induzierten Gen, handelt es sich um das hypoxieinduzierbare Zyklin G2 (CCNG2). Von Zyklinen (CCN) ist vor allem bekannt, dass sie Regulatoren des Zellzyklus sind (Hunter and Pines, 1991). In humanen Tumoren konnte durch eine veränderte CCN-Expression gezeigt werden, dass sie eine Rolle in der Karzinogenese spielen. In normalen Brustdrüsenzellen ist CCNG während des Zellzyklus am höchsten während der S- und G2/M-Phase exprimiert. Im Gegensatz dazu ist in Brustdrüsentumorzellen die zellzyklusabhängige CCNG-Induktion nicht mehr vorhanden (Reimer *et al.*, 1999). Kürzlich wurde gezeigt, dass CCNG in kolorektalen Tumoren überexprimiert wird (Perez *et al.*, 2003). Zudem wird CCNG in Brust- und Prostatatumoren überexprimiert (Keyomarsi and Pardee, 1993; Weinstat-Saslow *et al.*, 1995). Eine weitere Besonderheit von CCNG ist, dass dieses Protein wachstumsfördernd auf Osteosarkomzellen wirkt (Skotzko *et al.*, 1995).

Außer diesen aus der Literatur bekannten Genen, wurde die Induktion zweier unbekannter Gene, die durch *B. henselae* induziert wurden (KIAA0742, FLJ22182fis), mittels RT-PCR verifiziert. Für das Gen KIAA0742, das ebenfalls mittels quantitativer PCR verifiziert werden konnte **(Abb. 10)**, wurde anhand eines Sequenzvergleichs eine entfernte strukturelle Homologie zu einem *open reading frame* (ORF 48) von HHV-8 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Weil HHV-8 die Induktion vaskuloproliferativer Wachstumsfaktoren induziert (Nakamura *et al.*, 1988; Salahuddin *et al.*, 1988), ergibt sich die Möglichkeit über die Funktion dieses Gens in der *B. henselae*-induzierten Angiogenese zu spekulieren.
Interessanterweise war das proinflammatorisch und angiogenetisch wirksame Zytokin IL-8 das einzige durch *B. henselae* induzierte Gen, von dem eine NF-κB-Regulation bekannt ist (Koch *et al.*, 1992; Desbaillets *et al.*, 1997; Aggarwal, 2004). Bekannterweise wird das Zytokin aber auch durch andere Bakterien, wie z. B. *Y. enterocolitica* pYV$^-$, *E. coli* HB101 inv$^+$ (Grassl *et al.*, 2003) und *Salmonella* spp. (Sharma and Qadri, 2004; Huang *et al.*, 2004) induziert. Da neben IL-8 in *Y. enterocolitica*-Infektionen noch andere proinflammatorisch wirksame Zytokine und Adhäsionsmoleküle, wie z. B. GM-CSF, MCP-1, IL-1β und ICAM-1 induziert werden (Kampik *et al.*, 2000), wurden exemplarisch von einigen NF-κB-regulierten Genen (MCP-1, GM-CSF, IL-1β, ICAM-1) RT-PCRs durchgeführt, um falsch negative Gen-Chip-Daten auszuschließen. Warum ausschließlich IL-8 als NF-κB-reguliertes Gen durch *B. henselae* in HeLa-Zellen induziert wird, bleibt unklar.

4.1.2. Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort im HUVEC-Zellkulturmodell

Nachdem im Modell mit *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen die Induktion einer angiogenetischen Wirtszellantwort nachgewiesen werden konnte, wurden analog Gen-Chip-Experimente mit Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt und die Genexpressionsmuster von nicht-infizierten und infizierten Zellen miteinander verglichen **(Tab. 16)**. Grund für diese Untersuchungen waren die Erkenntnisse, dass *B. henselae* nach Infektion Endothelzellen kolonisiert und ähnlich wie für *Agrobacterium tumefaciens*, dem Erreger der Wurzelhalsgalle, beschrieben, die Wirtszellen als Lebensnische für Replikation und Wachstum nutzt (Kempf *et al.*, 2002).
Auffällig war, dass im Unterschied zu den epithelialen HeLa-Zellen in Endothelzellen zusätzlich Gene induziert wurden, die z. B. in inflammatorischen Erkrankungen sowie in der Karzinogenese eine Rolle spielen. Wie für HeLa-Zellen wurde die Geninduktion und

Proteinsekretion einiger der auf dem Gen-Chip als induziert angezeigten Gene auf RNA-Ebene (quantitative PCR und RT-PCR) sowie auf Proteinebene (Western Blot, ELISA) analysiert **(Abb. 20, 21).** Dabei wurde auf RNA- (VEGF, IL-8, ADM, GM-CSF, MCP-1, HK2) sowie auf Proteinebene (VEGF, IL-8) - wie schon in HeLa-Zellen - die Induktion einiger angiogenetisch (VEGF, IL-8, ADM) wirksamer Wachstumsfaktoren nach einer *B. henselae*-Infektion nachgewiesen, wobei VEGF nur in geringem Maß sekretiert wurde. Zusätzlich wurde auf RNA-Ebene die Induktion inflammatorischer Gene (GM-CSF, MCP-1) gezeigt. Weiterhin wurde in HUVECs die Induktion des glykolytischen Enzyms HK2 induziert. (Auf die Frage, warum in Epithelzellen (HeLa) vornehmlich angiogenetisch wirksame, jedoch außer IL-8 keine inflammatorischen Gene oder Gene, die in der angeborenen Immunität eine Rolle spielen, aktiviert wurden, wird in **Kapitel 4.5.** eingegangen).

Beide Zell-Linien (HeLa und HUVEC) wurden außerdem auf die Geninduktion des VEGF-Rezeptors KDR hin untersucht. Die Geninduktion für KDR konnte in Übereinstimmung zu früheren Veröffentlichungen jedoch nur in HUVEC gezeigt werden **(Abb. 10, 20)**, da KDR ein endothelzellspezifischer Rezeptor ist und folglich nur auf Endothelzellen und auf endothelialen Progenitorzellen, jedoch nicht auf HeLa-Zellen, exprimiert wird (Zeng *et al.*, 2003; Yamane *et al.*, 1994). KDR stellt einen hochaffinen Rezeptor für VEGF-A dar, der die meisten endothelialen Wachstums- und Überlebenssignale von VEGF-A vermittelt (Shibuya, 2003) und für die VEGF-stimulierte Endothelzellmigration und mikrovaskuläre Permeabilität verantwortlich ist (Zeng *et al.*, 2001; Gille *et al.*, 2001). Außerdem fördert VEGF Vaskulogenese, Arteriogenese und Angiogenese durch die Stimulation der Proliferation von Endothelzellen. Von beiden VEGF-Rezeptoren (Flt-1, KDR) ist außerdem bekannt, auf KS-Zellen in HHV-8-Infektionen und primären Tumorgewebe induziert zu werden (Masood *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2003).
Somit konnte durch die Gen-Chip-Analysen von HeLa- und HUVEC-Zellen ein durch *B. henslea*-induziertes angiogenetisches Genmuster nachgewiesen werden, das eine erstaunliche Ähnlichkeit zu früher beschriebenen Genexpressionsmustern aus Hypoxie-, Tumor- und Angiogenesemodellen aufweist (Semenza, 2000a; Koong *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2000).

4.2. Rolle der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und NF-κB in der Aktivierung der proangiogenetischen Wirtszellantwort nach *B. henselae*-Infektion

4.2.1. Aktivierung von HIF-1 nach einer *B. henselae*-Infektion

Da Hypoxie der physiologische Hauptstimulus für die VEGF-Sekretion darstellt und die hypoxieinduzierte Transkription des VEGF-Gens über HIF-1 vermittelt wird (Semenza, 2000a), wurde untersucht, durch welche Transkriptionsfaktoren die *B. henselae*-induzierten Gene reguliert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die meisten Gene bekanntermaßen direkt oder indirekt durch HIF-1 reguliert werden **(Tab. 15)**. Die HIF-1α-Untereinheit des Heterodimers stellt die regulatorisch aktive Untereinheit des Transkriptionsfaktors dar und wird nach Aktivierung in den Zellkern transloziert. Deshalb wurde die Aktivierung von HIF-1 anhand der α-Untereinheit untersucht (Pugh and Ratcliffe, 2003; Semenza, 2000b).

In vitro konnte die Aktivierung in HeLa- und HUVEC-Zellen in einem Zeitraum von 4-6 h nach Infektion nachgewiesen werden. Die HIF-1α-Aktivierung wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung, Western Blot, durch Benutzung eines Reportergen-Konstruktes (ein Plasmid, das einen dem Luziferase-Gen vorgeschalteten VEGF-Promotor enthält) und mittels EMSA, dargestellt **(Abb. 27)**. Weiterhin wurde *in vivo* durch immunhistochemische Färbungen in BA Patientenbiopsaten die nukleär lokalisierten HIF-1α-Untereinheiten dargestellt **(Abb. 29)**. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 wird durch die vorhergehenden Beobachtungen einer erhöhten VEGF-Sekretion in Wirtszellen nach einer *B. henselae*-Infektion sowie in BA und BPH Läsionen gestützt (Kempf *et al.*, 2001). Von Makrophagen, die diese BA Läsionen infiltrieren, ist außerdem bekannt, VEGF zu sekretieren (Resto-Ruiz *et al.*, 2002).
Um die direkte Abhängigkeit einer durch *B. henselae*-induzierten Aktivierung von HIF-1 und der damit verbundenen VEGF-Sekretion zu beweisen, wurden Versuche durchgeführt, in denen die HIF-1α-Untereinheit durch Verwendung von *si*RNA inhibiert wurde. Die direkte Beteiligung von HIF-1 an der VEGF-Sekretion konnte mittels Western Blot und ELISA bestätigt werden, da die Transfektion von infizierten Wirtszellen mit *si*RNA gegen die HIF-1α-Untereinheit zu einer deutlichen Abnahme der HIF-1-Aktivität bzw. der VEGF-Sekretion führte **(Abb. 12, 13)**.

In HUVEC konnte außer der Aktivierung von HIF-1 noch die Aktivierung von HIF-2, eines aus der gleichen Familie stammenden Transkriptionsfaktors, anhand von Western Blots nachgewiesen werden **(Abb. 22)**. Die *B. henselae*-induzierte HIF-2-Aktivierung in Endothelzellen wird durch Veröffentlichungen gestützt, die gezeigt haben, dass HIF-2 ein endothelzellspezifischer Transkriptionsfaktor ist, der - wie HIF-1 - an Vaskulogenese und Angiogenese beteiligt ist. HIF-2 wird außerdem eine Rolle in der Tumorentwicklung zugesprochen, da die Expression dieses Transkriptionsfaktors in Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte (Ema *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1997; Blancher *et al.*, 2000). Eine HIF-1-Aktivierung in Endothelzellen führt zur Induktion des VEGF-Rezeptors Flt-1 (Wenger, 2000; Gerber *et al.*, 1997), während eine HIF-2-Aktivierung die Expression des VEGF-Rezeptors KDR bewirkt (Josko and Mazurek, 2004). Die Expression des VEGF-Rezeptors KDR durch Endothelzellen wird auch durch *in vivo* Daten aus der Literatur gestützt, in denen beschrieben wurde, dass eine *B. bacilliformis*-Infektion von Endothelzellen beim Menschen zu einer Expression der VEGF-Rezeptoren Flt-1 und KDR führt (Cerimele *et al.*, 2003). Somit könnte die HIF-1- und HIF-2-Aktivierung in Endothelzellen, die zu einer Induktion der endothelzellspezifischen Rezeptoren Flt-1 und KDR führen, die VEGF-vermittelte angiogenetische Schleife durch eine vermehrte Induktion von VEGF-Rezeptoren verstärken, indem die Empfänglichkeit der Endothelzellen für sekretiertes VEGF gesteigert wird **(Abb. 25)**.

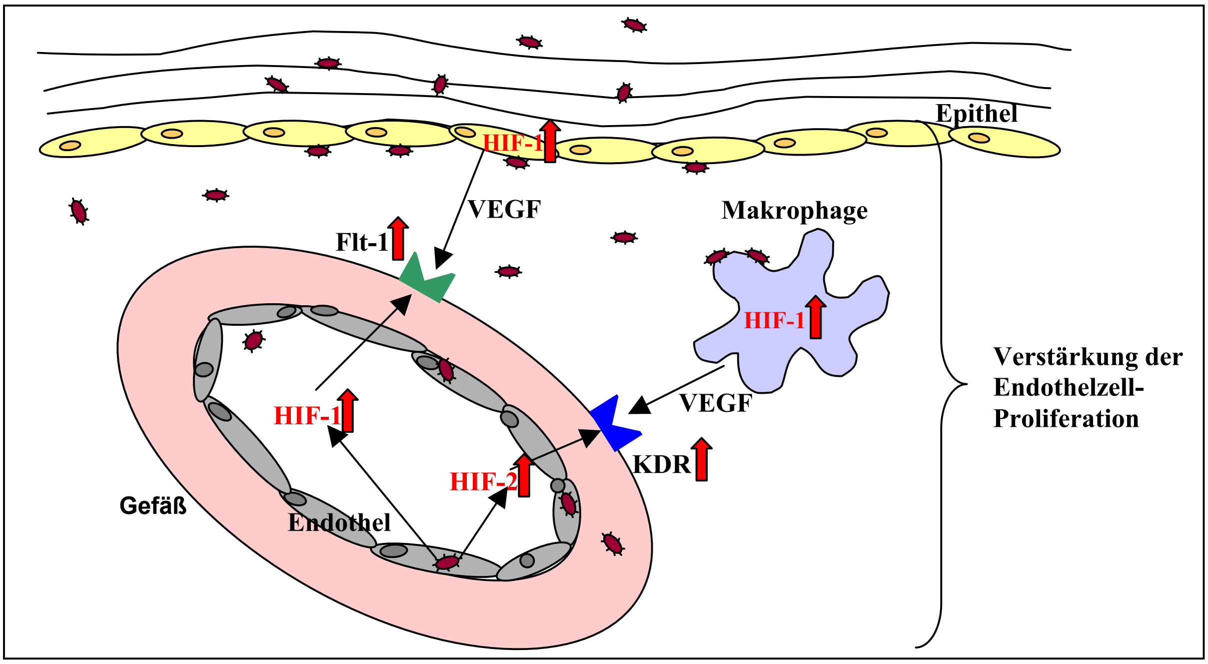


Abb. 25: Schematische Darstellung der hypothetischen Wechselwirkung *B. henselae*-infizierter Endothelzellen (EZ) mit nicht-endothelialen Effektorzellen (EFZ: Makrophagen, Epithelzellen), die zu einer verstärkten Angiogenese führen könnte.

Somit konnte durch verschiedene Methoden auf molekularer Ebene *in vitro* und *in vivo* der Nachweis erbracht werden, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 der Schlüsseltranskriptionsfaktor in der *B. henselae*-induzierten Angiogenese zu sein scheint. Ein weiteres Argument das für HIF-1 als Haupttranskriptionsfaktor in der *B. henselae*-vermittelten Angiogenese spricht, spiegelt sich im zeitlichen Ablauf der Infektion, die zur Transkriptionsaktivierung und schließlich zur Translation angiogenetisch relevanter Gene führt. In den verschiedenen Experimenten konnte die stärkste HIF-1-Aktivität in einem Zeitraum zwischen 3 und 6 h nach Infektion festgestellt werden. Somit scheint nach einer *Bartonella*-Infektion der Schritt von der Inaktivierung der Degradierung der α-Untereinheiten bis hin zur Akkumulation im Zellkern und der Bildung des transkriptionell aktiven Transkriptionsfaktors HIF-1 ca. 3 Stunden zu dauern. Die höchste Aktivität des Transkriptionsfaktors deckt sich wiederum mit der am deutlichsten darstellbaren Geninduktion 6 h nach Infektion, wie durch quantitative und RT-PCRs für alle der untersuchten Gene bestätigt werden konnte **(Abb. 10, 20)**. Der Zeitraum bis zur Translation der entsprechenden Gene scheint, wie anhand von ELISA-Daten veranschaulicht werden konnte, mindestens 24 h in Anspruch zu nehmen, zeigt aber eine messbare, stetig zunehmende Konzentration von, z. B. VEGF, bis zu 72 h nach Infektion der Wirtszellen mit *B. henselae*.

4.2.2. Aktivierung von NF-κB nach einer *B. henselae*-Infektion

Eine Besonderheit in der *B. henselae*-Infektion zeigt sich in der Induktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8, das neben den proinflammatorischen auch angiogenetische Eigenschaften besitzt (Koch *et al.*, 1992) und das einzige NF-κB-regulierte Gen im *B. henselae*-Hela-Zellkulturmodell darstellt. Die NF-κB-Aktivierung konnte in verschiedenen voneinander unabhängigen Methoden dargestellt werden **(Abb. 28)**.
Beim Vergleich von *B. henselae*-infizierten Epithelzellen (HeLa) bzw. Endothelzellen (HUVEC) zeigte sich, dass im Gegensatz zu HeLa-Zellen in Endothelzellen zusätzlich ein ganzes Muster an NF-κB-regulierten proinflammatorischen Genen induziert wurde (GM-CSF, MCP-1, IL-8, ICAM-1, **Tab. 16**). Gestützt wird die durch *B. henselae*-induzierte NF-κB-regulierte Induktion von proinflammatorischen Genen (z. B. E-Selektin, ICAM-1) durch schon veröffentlichte Daten (Fuhrmann *et al.*, 2001). Diese Daten könnten darauf hinweisen, dass die Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps ein wichtiger Schritt in der Pathogenese *B. henselae*-verursachter Vaskuloproliferation zu sein scheint. Es ist bekannt, dass *B. henselae* anhand des *vir*B-Typ IV Sekretions Systems (T4SS), das zur Etablierung der

B. henselae-Infektion essentiell ist, an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB beteiligt ist (Schmid *et al.*, 2004).

NF-κB spielt weiterhin eine Schlüsselrolle in der Apoptose (Karin and Lin, 2002). Für verschiedene extrazelluläre Bakterien (*Shigella flexneri*, *Salmonella* spp.) wurde gezeigt, dass sie über das Typ III Sekretions System Proteine (IpaB, SipB) ins Zytoplasma von Makrophagen injizieren, das in einer Aktivierung der pro-apoptotischen Caspase-1 resultiert (Navarre and Zychlinsky, 2000). Für Makrophagen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine konstitutive NF-κB-Aktivierung für die Aufrechterhaltung der Viabilität notwendig ist (Pagliari et al., 2000). Für *Yersinia* spp. ist bekannt, Apoptose über YopP/J-vermittelte NF-κB-Hemmung zu induzieren (Ruckdeschel *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu sind für intrazelluläre Bakterien antiapoptotische Strategien bekannt, wie z. B. für *Chlamydia pneumoniae* (Fischer *et al.*, 2001), oder für die Familie der α2-Proteobakterien, zu denen *Brucella suis* (Gross *et al.*, 2000) und *Rickettsia rickettsii* zählen (Clifton *et al.*, 1998). Ihre Strategien zielen darauf ab, den Verlust des zellulären Habitats zu verhindern (Kempf *et al.*, 2005b). Für *Bartonella* spp., ebenfalls zur Familie der α2-Proteobakterien gehörend, wurde gezeigt, Apoptose in Endothelzellen und Makrophagen durch Inhibition von Caspase-Aktivität und DNA-Fragmentierung zu hemmen (Kirby and Nekorchuk, 2002; Kempf *et al.*, 2005b). Dabei kommt die *B. henselae*-*virB*-T4SS vermittelte Inhibition der Apoptose (Schmid *et al.*, 2004), möglicherweise durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und durch die Induktion der VEGF-Wirtszellsekretion zustande (Kempf *et al.*, 2005a).

Somit konnte für *B. henselae* außer dem Nachweis einer HIF-Aktivierung auch der Nachweis der NF-κB-Aktivierung erbracht werden. Die NF-κB-Aktivierung durch *B. henselae* führt zu einer Sekretion proinflammatorischer Faktoren und zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen in humanen Endothelzellen und resultiert in einer Aktivierung des proinflammatorischen Phänotyps. Weiterhin bewirkt NF-κB die Hemmung der Wirtszellapoptose und könnte durch die Sekretion des bekanntermaßen proangiogenetisch wirksamen IL-8, zusammen mit der HIF-1-induzierten Sekretion angioproliferativer Wachstumsfaktoren, das Überleben von Endothelzellen steigern, das wiederum zu einer Förderung der Tumorbildung führen würde **(Abb. 26)**.

Das in HeLa- und HUVEC-Zellen durch *B. henselae* induzierte HIF-1-regulierte proangiogenetische Genmuster und die Induktion des NF-κB-regulierten sowohl proinflammatorisch als auch angiogenetisch wirksamen Zytokins IL-8, führte zur Etablierung eines hypothetischen Modells einer *B. henselae*-Infektion, das eine mögliche Beziehung zur bakteriellen Pathogenität aufzeigt **(**siehe **Abb. 26)**. Dieses Modell fügt sich in das Konzept des schon früher formulierten „*paracrine loop*“ Modells: Demnach schafft sich *B. henselae* eine geeignete Überlebens- und Replikationsnische (Kempf *et al.*, 2002), indem das Bakterium in Wirtszellen die Apoptose verhindert (Kempf *et al.*, 2005b; Kempf *et al.*, 2004; Kirby and Nekorchuk, 2002) und Sauerstoff sowie Energie (ATP) der Wirtszelle konsumiert.

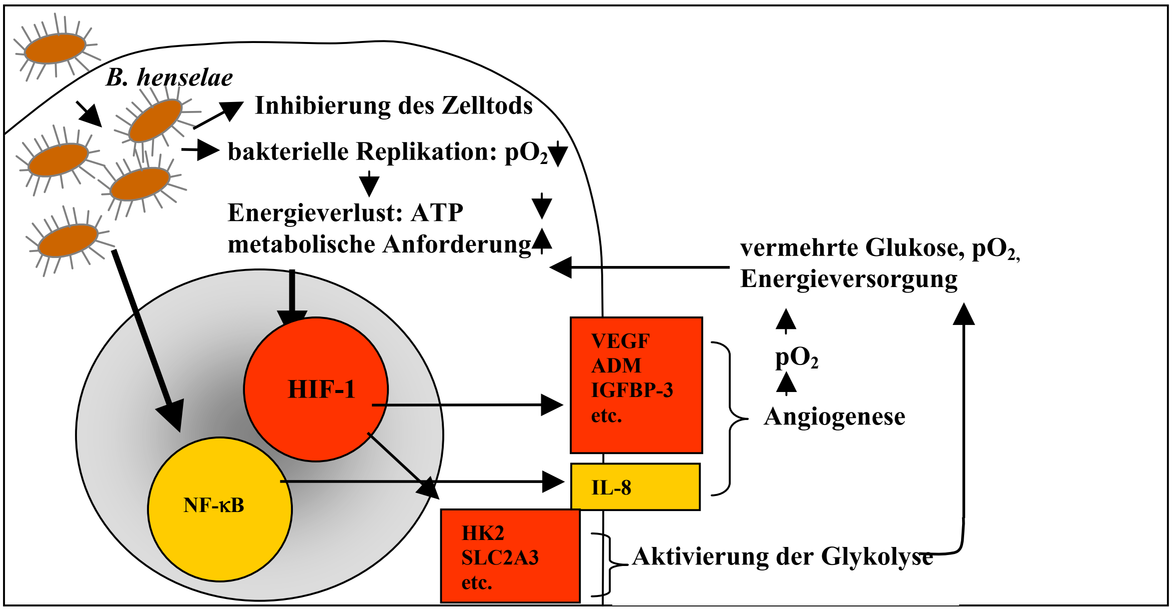


Abb. 26: Hypothetisches Modell einer *B. henselae*-Infektion und dessen mögliche Beziehung zur bakteriellen Pathogenität. Nach der Hypothese würde eine *Bartonella*-Infektion zu einer Inhibition der Wirtszellapoptose führen und damit eine Möglichkeit der intrazellulären bakteriellen Persistenz bzw. Replikation in der Wirtszelle schaffen. Dies führt zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und zum Absinken der ATP-Spiegel der Wirtszellen und bedingt wiederum die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1, der zu einer erhöhten Angiogenese durch Sekretion von angiogenetischen Wachstumsfaktoren, wie z. B. VEGF oder ADM, führt. Die NF-κB-regulierte IL-8-Induktion könnte ebenfalls zur Induktion der Angiogenese beitragen. Außerdem würde HIF-1 ebenfalls Gene induzieren, die den Glukosemetabolismus erhöhen (HK2, SLC2A3 etc.), um den gesteigerten metabolischen Bedarf der Wirtszelle zu decken. Diese gesteigerte Energieversorgung würde es *B. henselae* ermöglichen, innerhalb der Wirtszelle zu überleben. Somit würden diese Mechanismen einen für Bakterien günstigen Lebensraum sowie eine vorteilhafte Wachstumsnische schaffen.

Die Hypothese, dass *B. henselae* in der Wirtszelle Sauerstoff und Energie verbraucht, konnte experimentell bestätigt werden **(Abb. 35)**. Der Vergleich von *B. henselae*-infizierten mit nicht-infizierten HeLa-Zellen zeigte eine Sauerstoffabnahme in *B. henselae*-infizierten Zellen. Anhand der Messung zellulärer ATP-Spiegel konnte ein deutlich gesteigerter Energieverbrauch festgestellt werden. Die NF-κB- und die durch Sauerstoffunterversorgung verursachte HIF-1-Aktivierung resultieren in einer Induktion des angiogenetischen Programms sowie der Glykolyse, um die Nährstoffversorgung und die Energiebelieferung der Wirtszelle zu verbessern und die Zellproliferation zu unterstützen (Kempf *et al.*, 2005a). Belegt wird die These der Induktion eines angiogenetischen Genexpressionsmusters durch Ähnlichkeiten zu Genexpressionsmustern in anderen Angiogenesemodellen (Koong *et al.*, 2000; Lal *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 2003).

4.3. Regulation der HIF-1-Aktivität über Sauerstoffsensoren

HIF-1α wird über einen *HIF-1 alpha proteasome targeting factor* (HPTF) zum Ziel des Proteasoms. Die Expression von HPTF steht unter der direkten Kontrolle der HIF-1-vermittelten transkriptionellen Aktivität (Berra *et al.*, 2001). Nun konnte interessanterweise für PHD-2 gezeigt werden, dass das Genprodukt HIF-1-reguliert ist und die Kriterien eines HPTF erfüllt. HIF-1 könnte somit ähnlich wie p53, das seinen Proteinlevel über die Expression einer E3-Ligase kontrolliert, seine eigene Stabilität über die Kontrolle der PHD-2-Expression regeln (Berra *et al.*, 2003).

Weil *B. henselae* zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 führt, der bekannterweise durch Prolylhydroxylasen reguliert wird, bestand der nächste Schritt darin, die Induktion der PHDs durch *B. henselae* zu überprüfen. Nachdem früher gezeigt werden konnte, dass Prolyl- (PHD-1, -2, -3) und die Asparaginyl-Hydroxylase FIH-1 sauerstoffabhängig die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 regulieren (Bruick and McKnight, 2001; Epstein *et al.*, 2001), wurde in einem ersten Schritt mittels quantitativer PCR die Aktivierung der PHD-1-, PHD-2- und PHD-3-mRNA nach *B. henselae*-Infektion in HeLa-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich eine Induktion der PHD-2- und PHD-3-, nicht jedoch der PHD-1-mRNA **(Abb. 14)**. Diese Beobachtung spricht dafür, dass in HeLa-Zellen PHD-2 und PHD-3 - nicht aber PHD-1 - die Aktivität des Transkriptionsfaktors reguliert. Diese Ergebnisse stimmen mit schon veröffentlichten Daten für HeLa-Zellen überein, die gezeigt haben, dass PHD-2- und PHD-3-mRNA, nicht aber PHD-1-mRNA, durch Hypoxie

oder hypoxienachahmende Substanzen, wie z. B. Desferrioxamin (DFO) und Kobaltionen, induziert werden kann (Epstein *et al.*, 2001). Durch Silencing-Versuche mittels *si*RNA gegen jede PHD-Isoform wurde außerdem gezeigt, dass PHD-2 der Hauptregulator in der HIF-1α-Regulierung in HeLa-Zellen sowie in allen untersuchten humanen Zellen zu sein scheint (Berra *et al.*, 2003). Bei einem PHD-Vergleich *in vitro* stellte sich zudem heraus, dass PHD-2 die höchste Spezifität zur primären Hydroxylierungsstelle von HIF-1α besitzt. Diese Daten sprechen eher dafür, dass PHD-2 und PHD-3 die aktiven biologischen Sauerstoffsensoren *in vivo* sind (Huang *et al.*, 2002) und in der *B. henselae*-bedingten HIF-1-Aktivität eine wesentliche Rolle spielen.

Für die These, dass PHD-1 in erster Linie nicht als Regulator der HIF-1α-Untereinheit in *B. henselae*-Infektionen zu agieren scheint, spricht die Tatsache, dass die Expression von mPHD-1 die HIF-1α-Akkumulation und VEGF-Sekretion von Zellen supprimiert (Erez *et al.*, 2003). Außerdem konnte Tumorwachstum durch Injektion von Kolonkarzinomzellen, die mPHD-1 exprimieren, inhibiert werden. Die Inhibition des Tumorwachstums korrelierte hierbei mit gesteigerter Nekrose und einer Abnahme der Dichte der Mikrogefäße (Erez *et al.*, 2003).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die PHD-mRNA-Expression sowie die Proteinverfügbarkeit gewebespezifisch ist und somit alle 3 PHDs zur Regulierung des HIF-Systems beitragen könnten, was zu einer Flexibilität in der Regulation der HIF-Antwort auf Hypoxie führen würde (Appelhoff *et al.*, 2004). Untersuchungen zur Lokalisation der Prolylhydroxylasen ergaben, dass PHD-1 im Nukleus, PHD-2 hauptsächlich im Zytoplasma und PHD-3 sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma nachgewiesen wurde (Metzen *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse sprechen für ein Modell, in dem HIF-1α sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus durch eine Kaskade von Sauerstoffsensoren, die die Expression von HIF-1-Zielgenen kontrollieren, hydroxyliert wird.

Somit konnte in diesen ersten *in vitro* Experimenten zur Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 gezeigt werden, dass neben Hypoxie und hypoxienachahmenden Substanzen auch eine *B. henselae*-Infektion zu einer mRNA-Induktion von PHD-2 und PHD-3 führt. In weiterführenden Experimenten soll zunächst die Lokalisation von PHDs und FIH-1 durch die Überexpression von PHD- bzw. FIH- *green fluorescent protein* (EGFP)-Fusionsvektoren in *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen untersucht werden. Zukünftig könnten die Effekte von

PHDs und FIH-1 durch Gen-Silencing-Versuche mittels PHD- bzw. FIH-*si*RNA auf *B. henselae*-infizierte Hela-Zellen überprüft werden.

4.4. Posttranskriptionelle Regulierung der VEGF-Expression durch die p38 MAPK

Durch die hier beschriebenen Gen-Chip-Experimente mit HeLa- und HUVEC-Zellen konnte eine Induktion des NF-κB-regulierten proinflammatorisch und angiogenetisch wirksamen Zytokins IL-8 nach *B. henselae*-Infektion beobachtet und auf RNA- sowie Proteinebene bestätigt werden. Neben der Regulierung auf transkriptioneller Ebene durch NF-κB ist für IL-8 auch die Regulierung auf posttranskriptioneller Ebene, durch Stabilisierung der mRNA durch p38 MAPK, bekannt (Grassl *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002). In Versuchen mit humanen Ovarialtumor-Zellen wurde gezeigt, dass Hypoxie die NF-κB-vermittelte IL-8-Überexpression induziert, die mit der Progression der Tumoren assoziiert ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass unter Hypoxie auch die p38 MAPK-Signalkaskade aktiviert wird, die die IL-8-Gentranskription unter Hypoxie nochmals erhöht. Somit scheint durch diese Signalkaskade die IL-8-Expression und Angiogenese in humanen Ovarkarzinomzellen kontrolliert zu werden (Xu *et al.*, 2004).
Da gezeigt wurde, dass eine *B. henselae*-Infektion in Wirtszellen durch gesteigerten Sauerstoffverbrauch Hypoxie hervorruft **(Abb. 35 a-c),** war es von Interesse, ob eine *B. henselae*-Infektion ebenfalls eine Aktivierung der p38 MAPK hervorruft. In der Tat konnte nach einer *B. henselae*-Infektion eine deutlich erkennbare Aktivierung von p38 MAPK beobachtet werden **(Abb. 15)**. Die Fähigkeit p38 MAPK aktivieren zu können, war bereits von *B. bacilliformis* bekannt: hier führte eine Infektion von Endothelzellen ebenfalls zu einer Aktivierung von p38 MAPK (Verma and Ihler, 2002). Für ein weiteres Mitglied aus der Familie *Bartonella* spp., *B. quintana*, ist ebenfalls beschrieben worden, p38 MAPK zu aktivieren und die Produktion der IL-8-mRNA zu steigern (Liberto *et al.*, 2003). Außerdem besitzt *B. quintana* die Fähigkeit, in infizierten Wirtszellen einen proinflammatorischen Phänotyp stimulieren zu können, der mit der Produktion einer beträchtlichen Menge an IL-8, das neben proinflammatorischen auch angiogenetische Eigenschaften besitzt, assoziiert ist (Koch *et al.*, 1992). Obwohl die Rolle der p38 MAPK nach einer *Bartonella*-Infektion noch unbekannt ist, weisen einige Informationen auf eine Beteiligung dieser MAPK in der Induktion verschiedener proinflammatorischer Gene, wie z. B. TNF-α und IL-8, durch Effekte auf die Gentranskription, Translation oder auf die RNA-Stabilität hin (Liberto *et al.*, 2003).

Nachdem also gezeigt werden konnte, dass eine *B. henselae*-Infektion zu einer p38 MAPK-Aktivierung führt und diese MAPK bekanntermaßen die IL-8-Expression durch Stabilisierung der mRNA reguliert (Grassl *et al.*, 2003), stellte sich die Frage, ob eventuell auch VEGF durch aktiviertes p38 posttranskriptionell reguliert werden kann. In mehrfach wiederholten Experimenten, in denen die Stabilität der VEGF-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten via Lightcycler gemessen wurde, konnte eine deutliche Abnahme der VEGF-mRNA nach Zugabe eines RNA-Neusynthese Inhibitors (Actinomycin D) gezeigt werden. Allerdings resultierte die zusätzliche Zugabe eines p38 Inhibitors (SB 202190) nicht in einer weiteren Abnahme der VEGF-mRNA **(Abb. 16)**, was gegen eine posttranskriptionelle Regulation der *B. henselae*-induzierten VEGF-mRNA durch aktiviertes p38 spricht. Außerdem bestand zwischen den Versuchen eine hohe Varianz, so dass die verwendete Methode wahrscheinlich nicht für die Messung der Stabilisierung der VEGF-mRNA durch aktiviertes p38 geeignet zu sein scheint. Um die posttranskriptionelle Regulierung von *B. henselae*-induzierter VEGF-mRNA zu untersuchen, sollten diese Versuche daher durch andere, möglicherweise besser geeignete, Methoden wiederholt werden. Eine Möglichkeit bestünde darin, die Stabilität der VEGF-mRNA anhand von (i) Northern Blots oder mittels (ii) „human VEGF Quantikine mRNA Kit" (R&D-Systems) zu überprüfen, was den Vorteil hätte, die Verwendung von radioaktivmarkierten Sonden zu umgehen. Diese Methodik basiert auf einer Hybridisierung der Proben mit Digoxigenin-gekoppelten Detektionsproben. Die Menge der mRNA kann hierbei mittels ELISA bestimmt werden. Des weiteren könnte die posttranskriptionelle Regulierung der VEGF-mRNA durch Transfektion eines konstitutiv aktiven Luziferase-Gen-Konstruktes bestimmt werden. Hierbei ist auf einem pGL3-Basic-Vektor ein konstitutiv aktiver Promotor des Simianvirus 40 (P-SU40) einem Luziferasegen vorgeschaltet. Das Luziferasegen enthält hierbei die 3'untranslatierte Region (UTR) des VEGF-Gens, das für die mRNA-Stabilität verantwortlich ist (Winzen *et al.*, 2004). Durch die konstitutive Aktivität des Promotors wird das Gen konstitutiv transkribiert und translatiert und führt somit zu einem gleichmäßigen Luziferase-Signal. Infiziert man die Zellen zusätzlich mit *B. henselae*, könnten die aktivierten p38 MAPK die 3'UTR stabilisieren, was zu einem verstärkten Luziferase-Signal führen würde. Dementsprechend würde die Zugabe eines p38 Inhibitors die Stabilität der 3'UTR destabilisieren, zu einer geringeren Translation des Gens und somit zu einem schwächeren Luziferase-Signal führen. Diese Experimente konnten in dem zu Verfügung stehenden Zeitraum nicht mehr durchgeführt werden.

4.5. Abhängigkeit des *B. henselae*-induzierten angiogenetischen Genprogramms von BadA und LPS

Von den wenigen Faktoren, von denen bekannt ist, in der *Bartonella*-Wirtszell-Interaktion eine Rolle zu spielen, scheint der „Typ IV Pilus“ der wichtigste Pathogenitätsfaktor von *B. henselae* zu sein, der die Wirtszelladhäsion und VEGF-Sekretion vermittelt (Batterman *et al.*, 1995; Kempf *et al.*, 2001). Kürzlich konnte das bisher als „Typ IV Pilus“ bekannte Außenmembranprotein als BadA identifiziert werden. Es gehört zur Familie der nicht fimbriellen Adhäsine und vermittelt die Adhäsion von *B. henselae* an extrazelluläre Matrixproteine (EZM) und Endothelzellen. Außerdem verhindert BadA die Phagozytose durch J774A.1-Makrophagen (Riess *et al.*, 2004). Diese Beobachtung wird durch Daten aus der Literatur gestützt, die gezeigt haben, dass YadA, ein nicht-fimbrielles Adhäsin von *Yersinia enterocolitica*, ebenfalls die Adhärenz an Wirtszellen und EZM-Proteine vermittelt (Roggenkamp *et al.*, 1996; Schulze-Koops *et al.*, 1992). Diese nicht fimbriellen Adhäsine wurden bereits als neue Klasse bakterieller Adhäsine beschrieben, die außer bei enteropathogenen *Yersinia*-Spezies, wie z. B. *Y. enterocolitica* (*Yersinia* Adhäsin ‚YadA) auch bei *Neisseria meningitidis* (Neisseria Adhäsin, NadA), zu finden sind (Hoiczyk *et al.*, 2000; Comanducci *et al.*, 2002). Für BadA konnte außerdem die herausragende Beteiligung an der Induktion der angiogenetischen Wirtszellantwort auf mRNA-Ebene sowie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 als Resultat auf eine bakterielle Infektion nachgewiesen werden **(Abb. 17, 18)**. Diese Beobachtung wird durch weitere Daten gestützt, die zeigten, dass BadA die Sekretion weiterer proangiogenetischer Faktoren beeinflusst **(Abb. 30)**. Allerdings ist nicht bekannt, ob BadA direkt deren Expression induziert oder ob BadA z. B. die Adhäsion vermittelt und weitere darauffolgende Pathogen-Wirtszell-Interaktionen (z. B. T4SS-abhängig) zu tragen kommen. Es konnte für das nicht fimbrielle Adhäsin BadA klar gezeigt werden, dass seine Expression auf der Oberfläche von *B. henselae* für die Induktion einer proangiogenetischen Wirtszellantwort entscheidend ist. Somit könnte es sich hier um einen bedeutenden Pathogenitätsfaktor, mit einer möglichen Rolle in der Induktion der vaskulären Proliferation in BA und BPH, handeln (Riess *et al.*, 2004).

Weil für Lipopolysaccharide (LPS) beschrieben wurde, zu einer HIF-1-Aktivierung in Makrophagen zu führen (Blouin *et al.*, 2004), stellte sich die Frage, ob *B. henselae* LPS ebenfalls einen Effekt auf die HIF-1-Expression ausübt. Von *B. henselae* und *B. quintana* LPS ist im Gegensatz zu enterobakteriellem LPS bekannt, eine geringe endotoxische Aktivität

zu besitzen (Matera *et al.*, 2003; Zähringer *et al.*, 2004). LPS, das die Hauptkomponente der Außenmembran gramnegativer Bakterien darstellt, ist als starker Aktivator von Endothelzellen und Mitgliedern des Immun- und inflammatorischen Systems bekannt. LPS kann die NF-κB-Aktivierung bzw. proinflammatorische Antwort sowie die Endothelzellaktivierung direkt über das Binden an einen sogenannten „Toll-like Rezeptor“ (TLR4)/CD14 Komplex aktivieren. Des weiteren kann LPS indirekt durch eine Aktivierung von Immunzellen, die zu einer Induktion verschiedener inflammatorischer Mediatoren führt, die inflammatorische Antwort auslösen (Faure *et al.*, 2001). Interessanterweise konnte in HeLa-Zellen eine NF-κB-Aktivierung nach *Bartonella*-Infektion gezeigt werden (Kempf *et al.*, 2005a), obwohl diese Zellen im Gegensatz zu Endothelzellen bekanntermaßen keinen TLR-4 exprimieren (Pridmore *et al.*, 2001). Zuerst wurde die Zusammensetzung des *B. henselae* LPS von *B. henselae* Wildtyp, der BadA$^-$- und der Pil$^-$-Mutante per SDS-Gel aufgereinigt und deren Struktur miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass sich das LPS-Muster von *B. henselae* Wildtyp, Pil$^-$- und der BadA$^-$-Mutante voneinander nicht unterscheiden (Kyme *et al.*, 2003). Daraus resultierte die Schlussfolgerung, dass LPS für die Aktivierung von HIF-1 keine Rolle spielen kann, da *B. henselae* Wildtyp, aber nicht die Pil$^-$- und die BadA$^-$-Mutante HIF-1 aktivieren.

Um diese Vermutung experimentell abzusichern, wurden HeLa-Zellen mit gereinigtem *Bartonella* LPS behandelt. Allerdings konnte - wie erwartet - nach der *B. henselae* LPS-Stimulation von HeLa-Zellen keine HIF-1-Induktion beobachtet werden **(Abb. 19)**. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen stehen die bereits veröffentlichten Daten, die zeigten, dass LPS in Makrophagen HIF-1 aktiviert (Blouin *et al.*, 2004). Unsere Daten zeigen deutlich, dass *B. henselae* LPS keinen Effekt auf die HIF-Aktivierung und somit auf die Induktion einer angiogenetischen Antwort ausübt. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen überein, dass lebende *B. henselae* oder *B. henselae* LPS nicht zur Aktivierung von Endothelzellen benötigt werden, da die Endothelzellen, die angereinigten *B. henselae* OMPs exponiert wurden, aktiviert wurden (Fuhrmann *et al.*, 2001).

4.6. Induktion einer angiogenetischen Wirtszellantwort nach *B. henselae*-Infektion: eine einzigartige Pathogenitätsstrategie?

4.6.1. Vergleich von HIF-1-Aktivierung, VEGF-, IL-8-Geninduktion und Proteinsekretion nach bakterieller Infektion

Da *B. henselae* auf mRNA- sowie auf Proteinebene VEGF und das proangiogenetisch wirksame IL-8 induziert, war es von Interesse, ob diese Induktion ein *Bartonella*-spezifisches Phänomen ist oder ob die Infektion mit anderen Bakterien zu einer Induktion einer angiogenetischen Antwort führt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Epithelzellen (HeLa) mit verschiedenen Bakterien infiziert (*Y. enterocolitica* pYV$^+$, *Y. enterocolitica* pYV$^-$, *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv.$^+$, *Legionella pneumophila*) und die IL-8-Sekretion durch die Wirtszellen untersucht **(Abb. 32)**. Die Messung der IL-8-Sekretion zeigte, dass außer *B. henselae* auch *Y. enterocolitica* pYV$^-$ und *E. coli* HB 101 inv$^+$ in der Lage waren, in Wirtszellen die Sekretion von IL-8 hervorzurufen. Diese Beobachtungen decken sich mit publizierten Daten, die gezeigt haben, dass *Y. enterocolitica* pYV$^+$ die IL-8-Sekretion unterdrückt, *Y. enterocolitica* pYV$^-$ jedoch zu einer verstärkten IL-8-Sekretion in Epithelzellen führt (Schulte *et al.*, 1996). Außerdem ist bekannt, dass nicht-invasive Bakterien, wie z. B. *E. coli*, nicht in der Lage sind, in Epithelzellen eine IL-8-Sekretion als Antwort auf die Infektion hin auszulösen (Eckmann *et al.*, 1993). Umgekehrt konnten wir zeigen, dass eine *E. coli* Mutante (*E. coli* HB 101 inv$^+$), die das *inv*-Gen von *Y. enterocolitica* exprimiert, in der Lage war, eine IL-8-Sekretion hervorzurufen. Im Gegensatz zu veröffentlichten Daten (Chang *et al.*, 2004) konnten wir allerdings nicht zeigen, dass eine *L. pneumophila*-Infektion in Epithelzellen zu einer IL-8-Induktion führt.
Nachdem die IL-8-Sekretion nicht nur für *B. henselae* bestätigt wurde, stellte sich die Frage, wie sich eine Infektion der Wirtszellen auf die VEGF-Sekretion auswirkt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass nur *B. henselae* in der Lage war, in Wirtszellen eine VEGF-Sekretion auszulösen **(Abb. 31)**. Um diese Daten zu bestätigen, wurde anschließend die VEGF-Geninduktion durch Bakterieninfektion untersucht **(Abb. 23)**. Überraschenderweise zeigte sich, dass alle Bakterien außer *L. pneumophila* zu einer VEGF-mRNA-Induktion in der Lage waren. Da die VEGF-Geninduktion durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 induziert wird (Semenza, 2001a), sollte ebenfalls die HIF-1-Aktivierung mit den hier verwendeten Bakterien überprüft werden **(Abb. 33)**. Da gezeigt werden konnte, dass alle Bakterien außer *L. pneumophila* in der Lage

waren HIF-1 zu aktivieren, wurde hiermit die VEGF-Genexpression auf Transkriptionsfaktorebene bestätigt.

Dass *L. pneumophila* nicht zu einer HIF-1-Induktion führt, ist nicht überraschend, da eine solche Infektion keine vaskuloproliferativen Störungen, sondern eine proinflammatorische Antwort auslöst (Brieland *et al.*, 1995). Eine Infektion mit *Y. enterocolitica* führt bekanntermaßen ebenfalls zu einer inflammatorischen Antwort (Kampik *et al.*, 2000; Denecker *et al.*, 2002), zeigt jedoch im Gegensatz zu *L. pneumophila* eine HIF-1-Aktivierung. Begründet werden könnte dieser Unterschied in der HIF-1-Aktivierung damit, dass *Y. enterocolitica* ein sogenanntes Siderophor-Yersiniabactin (Ybt)-System sekretiert (Cornelis *et al.*, 1998; Heesemann *et al.*, 1993). Ybt stellt einen Eisentransporter dar, mit dem das Bakterium aus der Wirtszelle Eisen binden kann, das ins Zytosol des Bakteriums transportiert wird (Haag *et al.*, 1993; Jacobi *et al.*, 2001). Dieses Eisen stellt eine entscheidende Komponente für Enzyme dar, die für bakterielles Wachstum und Metabolismus benötigt werden. (Weinberg, 1978). Kürzlich konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass eine Zugabe von Ybt zu HeLa-Zellen zu einer HIF-1-Aktivierung führt, während bei einer zusätzlichen Eisenzugabe keine HIF-1-Aktivierung mehr zu erkennen war. Wurden die Zellen mit Desferrioxamin (DFO), einem bekannten Eisenchelator stimuliert (Blancher *et al.*, 2000), resultierte dies wieder in einer HIF-1-Aktivierung (Wurz & Kempf, unveröffentlichte Daten). Es ist bekannt, dass die HIF-Aktivität PHD-reguliert ist (Epstein *et al.*, 2001; Bruick and McKnight, 2001) und dass diese PHDs Eisen, das durch Histidin- und Aspartatsäurereste gebunden ist, für ihre Aktivität benötigen (Wenger, 2002). Die Aktivität dieser Sauerstoffsensoren kann entweder durch Sauerstoffmangel, Eisenchelatoren oder Austausch von Metallionen (z. B. Kobalt, Nickel) inaktiviert werden (Maxwell and Salnikow, 2004). Somit wäre es möglich, dass in dem hier verwendeten Zellkulturmodell Ybt die PHDs durch Eisenentzug inaktiviert, das zu einer Stabilisierung der HIF-1α-Untereinheit führt und in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 resultiert. In weiteren Versuchen soll nun geklärt werden, ob eine *B. henselae*-Infektion außer durch Sauerstoffverbrauch auch durch Inaktivierung der PHDs zu einer HIF-1-Aktivierung führt. Die Inaktivierung der PHDs würde dadurch zustande kommen, dass *B. henselae* der Wirtszelle das benötigte Eisen entzieht. Dies wäre ein weiterer *Bartonella*-regulierter Pathogenitätsmechanismus.

4.6.2. Zusammenhang zwischen angiogenetischer Wirtszellantwort und Zellviabilität

Die oben genannten Ergebnisse sprechen dafür, dass *Bartonella*-spezifische bakterielle Mechanismen für das Ablaufen einer angiogenetischen Antwort notwendig sind. Aus diesen Ergebnissen resultierte die Frage, warum eine Infektion von Wirtszellen mit verschiedenen Bakterien im Vergleich zu *B. henselae* zwar zu einer HIF-1-Aktivierung und zu einer VEGF-Geninduktion führt, aber keine Aktivierung des angiogenetischen Programms stattfindet.

Von vielen Mikroorganismen, wie z. B. von enteropathogenen, fakultativ intrazellulären Bakterien wie *Yersinia enterocolitica* (Ruckdeschel *et al.*, 1997), *Salmonella typhimurium* (Monack *et al.*, 1996) und *Shigella flexneri* (Zychlinsky *et al.*, 1996) ist bekannt, Wirtszellapoptose als Strategie für das eigene Überleben, für Infektion und Invasion von Zielgewebe entwickelt zu haben (Abul-Milh *et al.*, 2001). Um den Zusammenhang zwischen Wirtszelltod und initialer HIF-1-Aktivierung, die jedoch in keiner VEGF-Sekretion resultierte, zu überprüfen, wurde in einem nächsten Schritt die Viabilität von Zellen miteinander verglichen, die mit verschiedenen Bakterien infiziert wurden. Dabei fiel auf, dass die Infektion mit allen hier verwendeten Bakterien im Gegensatz zu *B. henselae*, von denen bekannt ist, den Zelltod der Wirtszellen zu inhibieren (Kempf *et al.*, 2005b; Kirby and Nekorchuk, 2002; Schmid *et al.*, 2004), in einer Verminderung der Viabilität bzw. im Zelltod der Wirtszellen resultiert **(Abb. 34)**. Allerdings können diese Daten nur zum Teil aus der Literatur belegt werden. Die hier generierten Daten zeigen, dass *Y. enterocolitica* pYV^+ und pYV^- schon 12 h nach Infektion von Epithelzellen zu einer Verminderung der Zellviabilität führen. Für Makrophagen sind derartige Beobachtungen bekannt, da *Y. enterocolitica* unter Beteiligung des Typ III Sekretionssystems und durch Hemmung der NF-κB-Aktivität die Induktion der Apoptose stimuliert, die zum Zelltod von Makrophagen führt (Ruckdeschel *et al.*, 1997; Ruckdeschel *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu stehen Daten von HeLa-Zellen, die nach einer *Y. enterocolitica*-Infektion zwar zytotoxische Veränderungen wie Abrundung und Ablösung von der Matrix sowie eine Hemmung der NF-κB-Aktivierung zeigen, aber in ihrer Zellviabilität und Apoptoserate nicht beeinflusst wurden (Ruckdeschel *et al.*, 1997; Ruckdeschel *et al.*, 1998).

Ähnlich wie für *Y. enterocolitica* konnten wir anhand der Versuche zur Zellviabilität zeigen, dass eine Infektion von HeLa-Zellen mit *E. coli* zu einer Abnahme der Zellviabilität und zum anschließenden Zelltod der Wirtszellen führt, was sich durch publizierte Daten untermauern

lässt (Abul-Milh *et al.*, 2001). Außerdem führt eine Infektion mit *E. coli*, ebenso wie mit *Y. enterocolitica*, zu einer Inhibition der NF-κB-Aktivität, die in einer Erhöhung der Wirtszellapoptose resultiert (Klumpp *et al.*, 2001). Schließlich konnte in dieser Arbeit für das fakultativ intrazelluläre Bakterium *L. pneumophila* gezeigt werden, die Zellviabilität von Hela-Zellen zu vermindern und zum Zelltod dieser Wirtszellen zu führen **(Abb. 34)**. Diese Beobachtungen werden durch Daten aus der Literatur gestützt, in denen beschrieben wurde, dass *L. pneumophila* die Fähigkeit besitzt, Apoptose und Nekrose in Makrophagen, Monozyten und alveolaren Epithelzellen auszulösen. Die Induktion der Apoptose wird hierbei durch bakterielles T4SS und in der Wirtszelle durch Aktivierung der mitochondrialen Todessignalkaskade ausgelöst (Zink *et al.*, 2002).

Es stellt sich die Frage, welchen Vorteil sich Bakterien aus der Induktion der Wirtszellapoptose ziehen. Von *L. pneumophila* ist bekannt, durch Induktion der Wirtszellapoptose den „*oxidative burst*" in Monozyten zu unterdrücken, was in einer Herabregulierung der bakteriziden Aktivität dieser Zellen resultiert (Jacob *et al.*, 1994). Weiterhin nutzen intrazelluläre Bakterien (*L. pneumophila*) die Induktion der Wirtszellapoptose als Strategie für ihre spätere Freisetzung aus der Wirtszelle (Gao and Abu, 1999). Ein Vorteil der induzierten Apoptose durch das Bakterium besteht darin, dass die Entzündungsreaktion an den Inflammationsherden gesenkt wird. Von apoptotischen Zellen ist bekannt, immunsuppressive Effekte ausüben, indem sie einerseits die Produktion antiinflammatorischer Zytokine erhöhen und andererseits die Sekretion proinflammatorischer Zytokine vermindern. Das ermöglicht den Bakterien verstärkt am Infektionsort zu wachsen (Voll *et al.*, 1997). Für *E. coli* wurde gezeigt, dass sich die Induktion der Wirtszellapoptose vorteilhaft für dessen Anheften an humane Epithelzellen auswirkt (Barnett *et al.*, 2000). Außerdem ist für *Yersinia*, *Salmonella* und *Shigella* spp. bekannt, die Induktion des Zelltodes zu nutzen, um die bakterielle Invasion und Toxinbelieferung bzw. die Zerstörung gefährlicher Makrophagen und Lymphozyten zu erleichtern, um das eigene Überleben zu sichern (Monack *et al.*, 1996; Zychlinsky *et al.*, 1996; Ruckdeschel *et al.*, 1997).

Im Gegensatz dazu ist von anderen intrazellulären bakteriellen Pathogenen wie von den fakultativ intrazellulären Bakterien *B. henselae* (Anderson and Neuman, 1997), *Mycobacterium tuberculosis* (Durrbaum-Landmann *et al.*, 1996) und *Brucella suis* (Gross *et al.*, 2000) sowie den obligat intrazellulären Bakterien *Chlamydia pneumoniae* (Rajalingam *et al.*, 2001) und *Rickettsia rickettsii* (Clifton *et al.*, 1998) als Überlebensstrategie bekannt, die Apoptose von Wirtszellen zu verhindern. Dieses Phänomen ist auch bei Viren zu beobachten, die die Wirtszelle zur Replikation benötigen. Um der eigenen Degradierung durch

Aktivierung der Apoptose durch die Wirtszelle zu entgehen, sind bei Viren Gene vorhanden, die das Apoptosesystem der Wirtszelle stören und Apoptose hemmen (Teodoro and Branton, 1997). Ein Bakterium, dessen Wachstum und Replikation von der Wirtszelle, bzw. von deren Stoffwechsel abhängig ist, gehört zur Familie der *Chlamydiacea*. Das obligat intrazelluläre Bakterium *C. pneumoniae* infiziert verschiedene Zell-Linien wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen und Epithelzellen, unterdrückt Apoptose und schafft sich so ein geeignetes Habitat (Gaydos *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 2001). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das fakultativ intrazelluläre Bakterium *B. henselae* gemacht: *B. henselae* inhibiert die Wirtszellapoptose in Endothelzellen und Makrophagen (Kirby and Nekorchuk, 2002; Kempf *et al.*, 2005b).

Es darf vermutet werden, dass die Inhibierung der Wirtszellapoptose durch *B. henselae* dazu führt, dass das angiogenetische Programm nach initialer HIF-1-Aktivierung auch auf Proteinebene weiter ablaufen kann und nicht, wie im Vergleich zu den anderen Bakterien, durch die Induktion der Wirtszellapoptose unterbrochen wird. Dies lässt darauf schließen, dass *B. henselae* sich gemäß des „*paracrine loop*" Modells (Kempf *et al.*, 2002) eine geeignete Lebens- und Replikationsnische schafft. Im Zuge der Infektion induziert das Bakterium die Bildung angioproliferativer Substanzen, die in dieser Arbeit näher charakterisiert werden konnten. Auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 fügt sich in das Bild des „*paracrine loop*" Modells, da gezeigt werden konnte, dass die Induktion dieser proangiogenetischen Faktoren HIF-1-reguliert ist. Folge dieser Geninduktion ist demnach die Sekretion dieser angiogenetischen Wachstumsfaktoren, die zu einer verstärkten Proliferation der Endothelzellen führt. Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, dass *B. henselae* die nicht-endothelialen Zellen zur Stimulation der proangiogenetischen Zytokinsynthese nutzt, während die Endothelzellen als Lebens- und Replikationsnische dienen könnten.

4.7. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zum ersten Mal gezeigt, dass eine *B. henselae*-Infektion sowohl in Epithel- als auch in Endothelzellen zu einer *B. henselae* BadA-abhängigen, jedoch nicht *B. henselae* LPS-abhängigen Induktion eines angiogenetischen „Gen-Cocktails" führt. Die Identifizierung von BadA als das für die Induktion angiogenetischer Substanzen entscheidende bakterielle Außenmembranprotein eröffnet die Möglichkeit neuer Therapiekonzepte zur Behandlung von z. B. ischämischen Erkrankungen mit Bakterien bzw.

einzelnen, bakteriellen Komponenten oder mit einem „Cocktail“ aus den beschriebenen angiogenetisch wirksamen Faktoren. Aus Studien ist bereits bekannt, dass der alleinige therapeutische Einsatz von VEGF erfolglos ist (Ferrara and Alitalo, 1999; Henry *et al.*, 2003). Der Einsatz eines „angiogenetischen Cocktails“ hingegen scheint erfolgsversprechender zu sein, da stabile Gefäße scheinbar auf eine wohldosierte Mischung angiogenetischer Faktoren angewiesen sind (Carmeliet, 2003). Der erbrachte Nachweis, dass HIF-1 die Transkription angiogenetischer Faktoren reguliert, spricht dafür, dass es sich bei HIF-1 um den wichtigsten Transkriptionsfaktor der Angiogenese handelt. Desweiteren wurde die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren, wie z. B. HIF-2 und NF-κB, sowie die Induktion des HIF-2-regulierten endothelzellspezifischen VEGF-Rezeptors KDR nach einer *B. henselae*-Infektion gezeigt. Da bereits beschrieben ist, dass HIF-1 PHD-reguliert ist (Epstein *et al.*, 2001; Bruick and McKnight, 2001), wurden hier bereits erste Untersuchungen zur Regulation der HIF-1-Aktivität durchgeführt. Die Rolle der PHDs in *B. henselae*-Infektionen und anderen bakteriellen Infektionen muss zukünftig noch genauer untersucht werden, da an der Entstehung von Erkrankungen wie BA und BPH die Beteiligung von HIF-1 nachgewiesen werden konnte. Folglich bestünde hier eine neue Möglichkeit, Infektionserkrankungen z. B. anhand der PHD-HIF-Kaskade zu modulieren. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Induktion einer angiogenetischen Wirtszellantwort ein *Bartonella*-spezifisches Phänomen ist und die Fähigkeit, Apoptose zu inhibieren, eine wesentliche Rolle spielt. Wahrscheinlich ermöglicht erst die Hemmung der Wirtszellapoptose durch *B. henselae* die Aktivierung des gesamten angiogenetischen Programms, das die Entstehung von BA und BPH fördert.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die *B. henselae*-induzierte Angiogenese auf zweifachem Wege erfolgen kann: (i) durch Aktivierung von HIF-1, was in einer Sekretion vaskuloproliferativer Zytokine (z. B. VEGF) durch Epithelzellen bzw. Makrophagen resultiert und (ii) durch die Aktivierung von HIF-1 und -2, wodurch die Zahl der entsprechenden (z. B. VEGF-) Rezeptoren auf Endothelzellseite und die Empfänglichkeit der Endothelzellen für das VEGF-Signal erhöht und die Wirkung des angiogenetischen Cocktails im „*paracrine loop*“ Modell verstärkt wird **(**siehe auch **Abb. 25)**.

5. Zusammenfassung

B. henselae-Infektionen resultieren in vaskuloproliferativen Störungen wie BA und BPH, die sich durch eine verstärkte Proliferation von Endothelzellen auszeichnen. Da angenommen wird, dass ein „angiogenetischer Cocktail" für die *B. henselae*-induzierte Endothelzellproliferation verantwortlich ist, wurden zunächst anhand eines HeLa-Zellkulturmodells Gen-Chip-Analysen zur Klärung der durch *B. henselae*-induzierten und vermutlich an der Angiogenese beteiligten Gene durchgeführt. Anschließend wurden diese Gen-Chip-Analysen mit Endothelzellen durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit führte zu folgenden Ergebnissen:

1) Auf mRNA- bzw. Proteinebene wurde die in Gen-Chip-Experimenten analysierte *B. henselae*-induzierte Geninduktion anhand exemplarischer Gene, die bekanntermaßen in der Angiogenese (VEGF, IL-8, ADM, IGFBP-3), Glykolyse (HK2) und Signaltransduktion (STC2, CCNG2, NDRG1) eine Rolle spielen, verifiziert. Im Gegensatz dazu war keine Induktion proinflammatorischer Gene (ICAM-1, MCP-1, IL-1β, GM-CSF), sowie eines endothelzellspezifischen VEGF-Rezeptors (KDR) zu beobachten. Die Induktion zweier Gene mit bisher unbekannter Funktion konnte bestätigt werden (FLJ22182fis, KIAA0742).
2) Durch Inhibitionsversuche der HIF-1α-Untereinheit mittels HIF-1α-*si*RNA konnte direkt über HIF-1α-Western Blots und indirekt über VEGF-ELISAs die Aktivierung eines HIF-1-getriggerten Genprogramms durch eine *B. henselae*-Infektion bestätigt werden.
3) Die Gen-Chip-Analysen *B. henselae*-infizierter Endothelzellen (HUVEC) zeigten im Vergleich mit HeLa-Zellen ein ähnliches Genexpressionsmuster. Zusätzlich zu den angiogenetisch wirksamen Faktoren wurden Gene, die in Apoptose, Inflammation, Immunität, Karzinogenese, Zellmetabolismus, Transport, Signaltransduktion und Streßantwort involviert sind, sowie Gene mit bisher unbekannter Funktion induziert.
4) Das induzierte Genmuster *B. henselae*-infizierter HUVEC konnte anhand einiger exemplarisch getesteter Gene auf mRNA- (ADM, MCP-1, GM-CSF ,VEGF, IL-8) bzw. auf Proteinebene (VEGF, IL-8) bestätigt werden. Außerdem wurde durch semi-quantitative PCR die Induktion zweier nicht auf dem Gen-Chip als induziert

angezeigter Gene beobachtet, von denen HK2 bekanntermaßen eine Rolle in der Glykolyse spielt und KDR einen endothelzellspezifischen VEGF-Rezeptor darstellt.

5) Mittels Western Blots wurde die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 und HIF-2 in HUVECs nach einer *B. henselae*-Infektion nachgewiesen.
6) Anhand semi-quantitativer PCRs konnte die Geninduktion von PHD-2 und -3, zwei bekanntermaßen die HIF-1-Aktivierung steuernden Prolylhydroxylasen, nicht jedoch von PHD-1, nach einer *B. henselae*-Infektion gezeigt werden.
7) p38 MAPK-Western Blots und Versuche zur Stabilisierung von VEGF-mRNA durch aktivierte p38 MAPK ergaben, dass p38 MAPK nach *B. henselae*-Infektion aktiviert wird, aber wahrscheinlich keine Rolle in der posttranskriptionellen Regulierung von VEGF spielt.
8) Anhand von Western Blots wurde gezeigt, dass die Expression von *B. henselae* BadA, nicht aber *B. henselae* LPS, für die HIF-1α-Aktivierung entscheidend ist.
9) Der Vergleich einer *B. henselae*-Infektion von HeLa-Zellen mit der von Kontroll-Bakterien zeigte, dass VEGF-mRNA durch alle hier verwendeten Bakterien (*B. henselae, Y. enterocolitica* pYV^{+}, *Y. e.* pYV^{-}, *E. coli* HB 101, *E. c.* HB 101 inv^{+}, *L. pneumophila*) induziert wurde. Weiterhin konnte anhand von Western Blots gezeigt werden, dass außer *L. pneumophila* alle Bakterien zu einer HIF-1α-Aktivierung in HeLa-Zellen führen. Im Gegensatz dazu bewirkte nur eine *B. henselae*-Infektion eine nachfolgende VEGF-Sekretion. Versuche zur Zellviabilität zeigten, dass alle hier verwendeten Bakterien außer *B. henselae* die Viabilität der Wirtszellen verringern.
10) Durch die Etablierung einer quantitativen Real-Time-PCR für das Gen KIAA0742 konnte die Induktion dieses unbekannten Gens nach einer *B. henselae*-Infektion im HeLa Gen-Chip-Experiment auch auf quantitativer Ebene verifiziert werden.
11) Experimente mit *B. henselae* Transposon-Mutanten ergaben, dass weitere Gene an der Regulation der VEGF-Geninduktion beteiligt sind.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern somit einen tieferen Einblick sowie ein besseres Verständnis der Zellbiologie nach *B. henselae*-Infektionen und eröffnen durch die bestehende Möglichkeit der Modulation der Angiogenese durch Bakterien neue Therapiekonzepte zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer erhöhten Vaskuloproliferation (Tumorerkrankungen, Arteriosklerose) oder mit Gefäßverschlüssen (ischämische Erkrankungen) assoziiert sind.

6. Literaturverzeichnis

1. Abul-Milh,M., Wu,Y., Lau,B., Lingwood,C.A. and Foster,D.B. (2001) Induction of epithelial cell death including apoptosis by enteropathogenic *Escherichia coli* expressing bundle-forming pili. *Infect Immun* 69: 7356-7364.

2. Aggarwal,B.B. (2004) Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 6: 203-208.

3. Alexander,B. (1995) A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 52: 354-359.

4. Amano,Y., Rumbea,J., Knobloch,J., Olson,J. and Kron,M. (1997) Bartonellosis in Ecuador: serosurvey and current status of cutaneous verrucous disease. *Am J Trop Med Hyg* 57: 174-179.

5. Amaral,M.C., Miles,S., Kumar,G. and Nel,A.E. (1993) Oncostatin-M stimulates tyrosine protein phosphorylation in parallel with the activation of p42MAPK/ERK-2 in Kaposi's cells. Evidence that this pathway is important in Kaposi cell growth. *J Clin Invest* 92: 848-857.

6. Anderson,B.E. and Neuman,M.A. (1997) *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 10: 203-219.

7. Appelhoff,R.J., Tian,Y.M., Raval,R.R., Turley,H., Harris,A.L., Pugh,C.W., Ratcliffe, P.J. and Gleadle, J.M. (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 279: 38458-38465.

8. Aprelikova,O., Chandramouli,G.V., Wood,M., Vasselli,J.R., Riss,J., Maranchie,J.K., Linehan,W.M. and Barrett,J.C. (2004) Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem* 92: 491-501.

9. Arany,Z., Huang,L.E., Eckner,R., Bhattacharya,S., Jiang,C., Goldberg,M.A., Bunn,H.F. and Livingston,D.M. (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12969-12973.

10. Arias-Stella,J., Lieberman,P.H., Erlandson,R.A. and Arias-Stella,J.Jr. (1986) Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of the verruga in Carrion's disease. *Am J Surg Pathol* 10: 595-610.

11. Arora,K.K., Fanciulli,M. and Pedersen,P.L. (1990) Glucose phosphorylation in tumor cells. Cloning, sequencing, and overexpression in active form of a full-length cDNA encoding a mitochondrial bindable form of hexokinase. *J Biol Chem* 265: 6481-6488.

12. Arvanitakis,L., Geras-Raaka,E., Varma,A., Gershengorn,M.C. and Cesarman,E. (1997) Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature* 385: 347-350.

13. Bais,C., Santomasso,B., Coso,O., Arvanitakis,L., Raaka,E.G., Gutkind,J.S., Asch,A.S., Cesarman,E., Gershengorn,M.C. and Mesri,E.A. (1998) G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* 391: 86-89.

14. Barnett,F.D., Abul-Milh,M., Huesca,M. and Lingwood,C.A. (2000) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* induces apoptosis which augments bacterial binding and phosphatidylethanolamine exposure on the plasma membrane outer leaflet. *Infect Immun* 68: 3108-3115.

15. Bass,J.W., Vincent,J.M. and Person,D.A. (1997) The expanding spectrum of *Bartonella* infections: I. Bartonellosis and trench fever. *Pediatr Infect Dis J* 16: 2-10.

16. Batterman,H.J., Peek,J.A., Loutit,J.S., Falkow,S. and Tompkins,L.S. (1995) *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun* 63: 4553-4556.

17. Battistini,B., Chailler,P., Orleans-Juste,P., Briere,N. and Sirois,P. (1993) Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* 14: 385-399.

18. Bechtel,J.T., Liang,Y., Hvidding,J. and Ganem,D. (2003) Host range of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J Virol* 77: 6474-6481.

19. Benson,L.A., Kar,S., McLaughlin,G. and Ihler,G.M. (1986) Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect Immun* 54: 347-353.

20. Bermond,D., Boulouis,H.J., Heller,R., Van Laere,G., Monteil,H., Chomel,B.B., Sander,A., Dehio,C. and Piemont,Y. (2002) *Bartonella bovis* Bermond et al. sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 383-390.

21. Berra,E., Milanini,J., Richard,D.E., Le,G.M., Vinals,F., Gothie,E., Roux,D., Pages,G. and Pouyssegur,J. (2000) Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol* 60: 1171-1178.

22. Berra,E., Richard,D.E., Gothie,E. and Pouyssegur,J. (2001) HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation. *FEBS Lett* 491: 85-90.

23. Berra,E., Benizri,E., Ginouves,A., Volmat,V., Roux,D. and Pouyssegur,J. (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 22: 4082-4090.

24. Bibb,W.F., Arnow,P.M., Dellinger,D.L. and Perryman,S.R. (1983) Isolation and characterization of a seventh serogroup of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 17: 346-348.

25. Birtles,R.J., Harrison,T.G., Saunders,N.A. and Molyneux,D.H. (1995) Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45: 1-8.

26. Birtles,R.J. and Raoult,D. (1996) Comparison of partial citrate synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *Int J Syst Bacteriol* 46: 891-897.

27. Blancher,C., Moore,J.W., Talks,K.L., Houlbrook,S. and Harris,A.L. (2000) Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 60: 7106-7113.

28. Blouin,C.C., Page,E.L., Soucy,G.M. and Richard,D.E. (2004) Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* 103: 1124-1130.

29. Boyer,H.W. and Roulland-Dussoix,D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41: 459-472.

30. Breier,G., Damert,A., Plate,K.H. and Risau,W. (1997) Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemost* 78: 678-683.

31. Brenner,D.J., O'Connor,S.P., Winkler,H.H. and Steigerwalt,A.G. (1993) Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. *Int J Syst Bacteriol* 43: 777-786.

32. Brieland,J.K., Remick,D.G., Freeman,P.T., Hurley,M.C., Fantone,J.C. and Engleberg,N.C. (1995) In vivo regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Infect Immun* 63: 3253-3258.

33. Brouqui,P., LaScola,B., Roux,V. and Raoult,D. (1999) Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N Engl J Med* 340: 184-189.

34. Bruick,R.K. and McKnight,S.L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337-1340.

35. Burger,M., Burger,J.A., Hoch,R.C., Oades,Z., Takamori,H. and Schraufstatter,I.U. (1999) Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. *J Immunol* 163: 2017-2022.

36. Burgess,A.W. and Anderson,B.E. (1998) Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. *Microb Pathog* 25: 157-164.

37. Cangul,H. (2004) Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. *BMC Genet* 5: 27.

38. Carmeliet,P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395.

39. Carmeliet,P. and Jain,R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257.

40. Carmeliet,P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660.

41. Caron,K.M. and Smithies,O. (2001) Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 615-619.

42. Cascales,E. and Christie,P.J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 1: 137-149.

43. Cerimele,F., Brown,L.F., Bravo,F., Ihler,G.M., Kouadio,P. and Arbiser,J.L. (2003) Infectious Angiogenesis: *Bartonella bacilliformis* Infection Results in Endothelial Production of Angiopoetin-2 and Epidermal Production of Vascular Endothelial Growth Factor. *Am J Pathol* 163: 1321-1327.

44. Chan,J.K., Lewin,K.J., Lombard,C.M., Teitelbaum,S. and Dorfman,R.F. (1991) Histopathology of bacillary angiomatosis of lymph node. *Am J Surg Pathol* 15: 430-437.

45. Chang,A.C. and Reddel,R.R. (1998) Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: stanniocalcin 2. *Mol Cell Endocrinol* 141: 95-99.

46. Chang,A.C., Jellinek,D.A. and Reddel,R.R. (2003) Mammalian stanniocalcins and cancer. *Endocr Relat Cancer* 10: 359-373.

47. Chang,B., Amemura-Maekawa,J., Kura,F., Kawamura,I. and Watanabe,H. (2004) Expression of IL-6 and TNF-alpha in human alveolar epithelial cells is induced by invading, but not by adhering, *Legionella pneumophila*. *Microb Pathog* 37: 295-302.

48. Chang,Y., Cesarman,E., Pessin,M.S., Lee,F., Culpepper,J., Knowles,D.M. and Moore,P.S. (1994) Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266: 1865-1869.

49. Charpentier,A.H., Bednarek,A.K., Daniel,R.L., Hawkins,K.A., Laflin,K.J., Gaddis,S., MacLeod,M.C. and Aldaz,C.M. (2000) Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res* 60: 5977-5983.

50. Chastanet,A., Derre,I., Nair,S. and Msadek,T. (2004) clpB, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J Bacteriol* 186: 1165-1174.

51. Chen,E.Y., Mazure,N.M., Cooper,J.A. and Giaccia,A.J. (2001) Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res* 61: 2429-2433.

52. Cheng,N., Brantley,D.M. and Chen,J. (2002) The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 75-85.

53. Chomel,B.B., Kasten,R.W., Floyd-Hawkins,K., Chi,B., Yamamoto,K., Roberts-Wilson,J., Gurfield,A.N., Abbott,R.C., Pedersen,N.C. and Koehler,J.E. (1996) Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol* 34: 1952-1956.

54. Chomel,B.B., Kasten,R.W., Sykes,J.E., Boulouis,H.J. and Breitschwerdt,E.B. (2003) Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. *Ann N Y Acad Sci* 990: 267-278.

55. Chu,Z.L., McKinsey,T.A., Liu,L., Gentry,J.J., Malim,M.H. and Ballard,D.W. (1997) Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10057-10062.

56. Clifton,D.R., Goss,R.A., Sahni,S.K., van Antwerp,D., Baggs,R.B., Marder,V.J., Silverman,D.J. and Sporn,L.A. (1998) NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cellsurvival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4646-4651.

57. Comanducci,M., Bambini,S., Brunelli,B., Adu-Bobie,J., Arico,B., Capecchi,B., Giuliani,M.M., Masignani,V., Santini,L., Savino,S., Granoff,D.M., Caugant,D.A., Pizza,M., Rappuoli,R. and Mora,M. (2002) NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 195: 1445-1454.

58. Conley,T., Slater,L. and Hamilton,K. (1994) *Rochalimaea* species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro. *J Lab Clin Med* 124: 521-528.

59. Conrad,P.W., Freeman,T.L., Beitner-Johnson,D. and Millhorn,D.E. (1999) EPAS1 trans-activation during hypoxia requires p42/p44 MAPK. *J Biol Chem* 274: 33709-33713.

60. Cornelis,G.R., Boland,A., Boyd,A.P., Geuijen,C., Iriarte,M., Neyt,C., Sory,M.P. and Stainier,I. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1315-1352.

61. Dehio,C., Meyer,M., Berger,J., Schwarz,H. and Lanz,C. (1997) Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci* 110 (Pt 18): 2141-2154.

62. Dehio,C. and Sander,A. (1999) *Bartonella* as emerging pathogens. *Trends Microbiol* 7: 226-228.

63. Dehio,C. (2001) *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol* 9: 279-285.

64. Dehio,C., Lanz,C., Pohl,R., Behrens,P., Bermond,D., Piemont,Y., Pelz,K. and Sander,A. (2001) *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1557-1565.

65. Dehio,C. (2003) Recent progress in understanding *Bartonella*-induced vascular proliferation. *Curr Opin Microbiol* 6: 61-65.

66. Dehio,C. (2004) Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 58: 365-390.

67. Denecker,G., Totemeyer,S., Mota,L.J., Troisfontaines,P., Lambermont,I., Youta,C., Stainier,I., Ackermann,M. and Cornelis,G.R. (2002) Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun* 70: 3510-3520.

68. Derrick,S.C. and Ihler,G.M. (2001) Deformin, a substance found in *Bartonella bacilliformis* culture supernatants, is a small, hydrophobic molecule with an affinity for albumin. *Blood Cells Mol Dis* 27: 1013-1019.

69. Desbaillets,I., Diserens,A.C., Tribolet,N., Hamou,M.F. and Van Meir,E.G. (1997) Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med* 186: 1201-1212.

70. Drancourt,M., Birtles,R., Chaumentin,G., Vandenesch,F., Etienne,J. and Raoult,D. (1996) New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* 347: 441-443.

71. Durrbaum-Landmann,I., Gercken,J., Flad,H.D. and Ernst,M. (1996) Effect of in vitro infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infect Immun* 64: 5384-5389.

72. Dvorak,H.F., Nagy,J.A., Feng,D., Brown,L.F. and Dvorak,A.M. (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 97-132.

73. Ebert,B.L. and Bunn,H.F. (1998) Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 18: 4089-4096.

74. Eckmann,L., Kagnoff,M.F. and Fierer,J. (1993) Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 61: 4569-4574.

75. Elferink,J.G. and de Koster,B.M. (1996) Modulation of human neutrophil chemotaxis by the endothelin-B receptor agonist sarafotoxin S6c. *Chem Biol Interact* 101: 165-174.

76. Ellis,B.A., Regnery,R.L., Beati,L., Bacellar,F., Rood,M., Glass,G.G., Marston,E., Ksiazek,T.G., Jones,D. and Childs,J.E. (1999) Rats of the genus *Rattus* are reservoir hosts for pathogenic *Bartonella* species: an Old World origin for a New World disease? *J Infect Dis* 180: 220-224.

77. Elvert,G., Kappel,A., Heidenreich,R., Englmeier,U., Lanz,S., Acker,T., Rauter,M., Plate,K., Sieweke,M., Breier,G. and Flamme,I. (2003) Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* 278: 7520-7530.

78. Ema,M., Taya,S., Yokotani,N., Sogawa,K., Matsuda,Y. and Fujii-Kuriyama,Y. (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4273-4278.

79. Epstein,A.C., Gleadle,J.M., McNeill,L.A., Hewitson,K.S., O'Rourke,J., Mole,D.R., Mukherji,M., Metzen,E., Wilson,M.I., Dhanda,A., Tian,Y.M., Masson,N., Hamilton,D.L., Jaakkola,P., Barstead,R., Hodgkin,J., Maxwell,P.H., Pugh,C.W., Schofield,C.J. and Ratcliffe,P.J. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43-54.

80. Erez,N., Milyavsky,M., Eilam,R., Shats,I., Goldfinger,N. and Rotter,V. (2003) Expression of prolyl-hydroxylase-1 (PHD1/EGLN2) suppresses hypoxia inducible factor-1alpha activation and inhibits tumor growth. *Cancer Res* 63: 8777-8783.

81. Faure,E., Thomas,L., Xu,H., Medvedev,A., Equils,O. and Arditi,M. (2001) Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol* 166: 2018-2024.

82. Ferrara,N. and Davis-Smyth,T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25.

83. Ferrara,N. and Alitalo,K. (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5: 1359-1364.

84. Ferrara,N. (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 1-30.

85. Ferrara,N. (2000) Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 55: 15-35.

86. Filvaroff,E.H., Guillet,S., Zlot,C., Bao,M., Ingle,G., Steinmetz,H., Hoeffel,J., Bunting,S., Ross,J., Carano,R.A., Powell-Braxton,L., Wagner,G.F., Eckert,R., Gerritsen,M.E. and French,D.M. (2002) Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice. *Endocrinology* 143: 3681-3690.

87. Fischer,S.F., Schwarz,C., Vier,J. and Hacker,G. (2001) Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect Immun* 69: 7121-7129.

88. Flore,O., Rafii,S., Ely,S., O'Leary,J.J., Hyjek,E.M. and Cesarman,E. (1998) Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nature* 394: 588-592.

89. Folkman,J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186.

90. Folkman,J., Merler,E., Abernathy,C. and Williams,G. (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133: 275-288.

91. Folkman,J. (1984) What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 51: 601-604.

92. Folkman,J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31.

93. Fournier,P.E., Lelievre,H., Eykyn,S.J., Mainardi,J.L., Marrie,T.J., Bruneel,F., Roure,C., Nash,J., Clave,D., James,E., Benoit-Lemercier,C., Deforges,L., Tissot-Dupont,H. and Raoult,D. (2001) Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine (Baltimore)* 80: 245-251.

94. Frees,D., Chastanet,A., Qazi,S., Sorensen,K., Hill,P., Msadek,T. and Ingmer,H. (2004) Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 54: 1445-1462.

95. Fuhrmann,O., Arvand,M., Gohler,A., Schmid,M., Krull,M., Hippenstiel,S., Seybold,J., Dehio,C. and Suttorp,N. (2001) *Bartonella henselae* induces NF-kappaB-dependent

upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect Immun* 69: 5088-5097.

96. Gagliardi,A.D., Kuo,E.Y., Raulic,S., Wagner,G.F. and DiMattia,G.E. (2004) Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth suppressive properties in transgenic mice independent of growth hormone and IGFs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

97. Gao,L.Y. and Abu,K.Y. (1999) Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect Immun* 67: 4886-4894.

98. Garcia,F.U., Wojta,J., Broadley,K.N., Davidson,J.M. and Hoover,R.L. (1990) *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo. *Am J Pathol* 136: 1125-1135.

99. Gaydos,C.A., Summersgill,J.T., Sahney,N.N., Ramirez,J.A. and Quinn,T.C. (1996) Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immun* 64: 1614-1620.

100. Gerber,H.P., Condorelli,F., Park,J. and Ferrara,N. (1997) Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 272: 23659-23667.

101. Ghosh,S., May,M.J. and Kopp,E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260.

102. Ghosh,S. and Karin,M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl: S81-S96.

103. Gille,H., Kowalski,J., Li,B., LeCouter,J., Moffat,B., Zioncheck,T.F., Pelletier,N. and Ferrara,N. (2001) Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 276: 3222-3230.

104. Gottschalk,L.R., Giannola,D.M. and Emerson,S.G. (1993) Molecular regulation of the human IL-3 gene: inducible T cell-restricted expression requires intact AP-1 and Elf-1 nuclear protein binding sites. *J Exp Med* 178: 1681-1692.

105. Grassl,G.A., Kracht,M., Wiedemann,A., Hoffmann,E., Äpfelbacher,M., von Eichel-Streiber,C., Bohn,E. and Autenrieth,I.B. (2003) Activation of NF-kappaB and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell Microbiol* 5: 957-971.

106. Grimshaw,M.J., Hagemann,T., Ayhan,A., Gillett,C.E., Binder,C. and Balkwill,F.R. (2004) A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer Res* 64: 2461-2468.

107. Gross,A., Terraza,A., Ouahrani-Bettache,S., Liautard,J.P. and Dornand,J. (2000) In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* 68: 342-351.

108. Grutzkau,A., Kruger-Krasagakes,S., Baumeister,H., Schwarz,C., Kogel,H., Welker,P., Lippert,U., Henz,B.M. and Moller,A. (1998) Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell* 9: 875-884.

109. Gu,Y.Z., Moran,S.M., Hogenesch,J.B., Wartman,L. and Bradfield,C.A. (1998) Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 7: 205-213.

110. Haag,H., Hantke,K., Drechsel,H., Stojiljkovic,I., Jung,G. and Zahner,H. (1993) Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol* 139: 2159-2165.

111. Heesemann J. and Grüter L. (1987) Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 40: 37-41.

112. Heesemann,J., Hantke,K., Vocke,T., Saken,E., Rakin,A., Stojiljkovic,I. and Berner,R. (1993) Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol Microbiol* 8: 397-408.

113. Heidbreder,M., Fröhlich,F., Johren,O., Dendorfer,A., Qadri,F. and Dominiak,P. (2003) Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression. *FASEB J* 17: 1541-1543.

114. Henry,T.D., Annex,B.H., McKendall,G.R., Azrin,M.A., Lopez,J.J., Giordano,F.J., Shah,P.K., Willerson,J.T., Benza,R.L., Berman,D.S., Gibson,C.M., Bajamonde,A., Rundle,A.C., Fine,J. and McCluskey,E.R.; VIVA Investigators (2003) The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107: 1359-1365.

115. Hogenesch,J.B., Chan,W.K., Jackiw,V.H., Brown,R.C., Gu,Y.Z., Pray-Grant,M., Perdew,G.H. and Bradfield,C.A. (1997) Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 272: 8581-8593.

116. Hoiczyk,E., Roggenkamp,A., Reichenbecher,M., Lupas,A. and Heesemann,J. (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* 19: 5989-5999.

117. Holtmann,H., Winzen,R., Holland,P., Eickemeier,S., Hoffmann,E., Wallach,D., Malinin,N.L., Cooper,J.A., Resch,K. and Kracht,M. (1999) Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 19: 6742-6753.

118. Honda,S., Kashiwagi,M., Ookata,K., Tojo,A. and Hirose,S. (1999) Regulation by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) of expression of stanniocalcin messages in the rat kidney and ovary. *FEBS Lett* 459: 119-122.

119. Huang,L.E., Arany,Z., Livingston,D.M. and Bunn,H.F. (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271: 32253-32259.

120. Huang,L.E., Gu,J., Schau,M. and Bunn,H.F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7987-7992.

121. Huang,J., Zhao,Q., Mooney,S.M. and Lee,F.S. (2002) Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 277: 39792-39800.

122. Huang,F.C., Werne,A., Li,Q., Galyov,E.E., Walker,W.A. and Cherayil,B.J. (2004) Cooperative interactions between flagellin and SopE2 in the epithelial interleukin-8 response to *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infection. *Infect Immun* 72: 5052-5062.

123. Hunter,T. and Pines,J. (1991) Cyclins and cancer. *Cell* 66: 1071-1074.

124. Israel,A. (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* 10: 129-133.

125. Ito,D., Walker,J.R., Thompson,C.S., Moroz,I., Lin,W., Veselits,M.L., Hakim,A.M., Fienberg,A.A. and Thinakaran,G. (2004) Characterization of stanniocalcin 2, a novel target of the mammalian unfolded protein response with cytoprotective properties. *Mol Cell Biol* 24: 9456-9469.

126. Ivan,M., Kondo,K., Yang,H., Kim,W., Valiando,J., Ohh,M., Salic,A., Asara,J.M., Lane,W.S. and Kaelin,W.G.Jr. (2001) HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science* 292: 464-468.

127. Iwaki-Egawa,S. and Ihler,G.M. (1997) Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins. *FEMS Microbiol Lett* 157: 207-217.

128. Iyer,N.V., Kotch,L.E., Agani,F., Leung,S.W., Laughner,E., Wenger,R.H., Gassmann,M., Gearhart,J.D., Lawler,A.M., Yu,A.Y. and Semenza,G.L. (1998) Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12: 149-162.

129. Jaakkola,P., Mole,D.R., Tian,Y.M., Wilson,M.I., Gielbert,J., Gaskell,S.J., Kriegsheim,Av., Hebestreit,H.F., Mukherji,M., Schofield,C.J., Maxwell,P.H., Pugh,C.W. and Ratcliffe,P.J. (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468-472.

130. Jacob,T., Escallier,J.C., Sanguedolce,M.V., Chicheportiche,C., Bongrand,P., Capo,C. and Mege,J.L. (1994) *Legionella pneumophila* inhibits superoxide generation in human monocytes via the down-modulation of alpha and beta protein kinase C isotypes. *J Leukoc Biol* 55: 310-312.

131. Jacobi,C.A., Gregor,S., Rakin,A. and Heesemann,J. (2001) Expression analysis of the yersiniabactin receptor gene fyuA and the heme receptor hemR of *Yersinia enterocolitica* in vitro and in vivo using the reporter genes for green fluorescent protein and luciferase. *Infect Immun* 69: 7772-7782.

132. Jacomo,V., Kelly,P.J. and Raoult,D. (2002) Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 8-18.

133. Jewell,U.R., Kvietikova,I., Scheid,A., Bauer,C., Wenger,R.H. and Gassmann,M. (2001) Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 15: 1312-1314.

134. Jiang,B.H., Zheng,J.Z., Aoki,M. and Vogt,P.K. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1749-1753.

135. Josko,J. and Mazurek,M. (2004) Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit* 10: RA89-RA98.

136. Kahn,J., Mehraban,F., Ingle,G., Xin,X., Bryant,J.E., Vehar,G., Schoenfeld,J., Grimaldi,C.J., Peale,F., Draksharapu,A., Lewin,D.A. and Gerritsen,M.E. (2000) Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis. *Am J Pathol* 156: 1887-1900.

137. Kallio,P.J., Okamoto,K., O'Brien,S., Carrero,P., Makino,Y., Tanaka,H. and Poellinger,L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J* 17: 6573-6586.

138. Kallio,P.J., Wilson,W.J., O'Brien,S., Makino,Y. and Poellinger,L. (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274: 6519-6525.

139. Kampik,D., Schulte,R. and Autenrieth,I.B. (2000) *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia infections*. *Infect Immun* 68: 2484-2492.

140. Kano,H., Kohno,M., Yasunari,K., Yokokawa,K., Horio,T., Ikeda,M., Minami,M., Hanehira,T., Takeda,T. and Yoshikawa,J. (1996) Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 14: 209-213.

141. Karin,M. and Ben-Neriah,Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621-663.

142. Karin,M. and Lin,A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3: 221-227.

143. Kataoka,H., Igarashi,H., Kanamori,M., Ihara,M., Wang,J.D., Wang,Y.J., Li,Z.Y., Shimamura,T., Kobayashi,T., Maruyama,K., Nakamura,T., Arai,H., Kajimura,M., Hanai,H., Tanaka,M. and Sugimura,H. (2004) Correlation of EPHA2 overexpression with high microvessel count in human primary colorectal cancer. *Cancer Sci* 95: 136-141.

144. Kato,H., Shichiri,M., Marumo,F. and Hirata,Y. (1997) Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology* 138: 2615-2620.

145. Kedzierski,R.M. and Yanagisawa,M. (2001) Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 851-876.

146. Kempf,V.A., Schaller,M., Behrendt,S., Volkmann,B., Äpfelbacher,M., Cakman,I. and Autenrieth,I.B. (2000) Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cell Microbiol* 2: 431-441.

147. Kempf,V.A., Volkmann,B., Schaller,M., Sander,C.A., Alitalo,K., Riess,T. and Autenrieth,I.B. (2001) Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol* 3: 623-632.

148. Kempf,V.A., Hitziger,N., Riess,T. and Autenrieth,I.B. (2002) Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? *Trends Microbiol* 10: 269-275.

149. Kempf,V.A., Lebiedziejewski,M., Alitalo,K., Wälzlein,J.H., Ehehalt,U., Fiebig,J., Huber,S., Schütt,B., Sander,C.A., Müller,S., Grassl,G., Yazdi,A.S., Brehm,B. and Autenrieth,I.B. (2005a) Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacillary Angiomatosis. Evidence for a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacterial Infections. *Circulation*.

150. Kempf,V.A., Schairer,A., Neumann,D., Grassl,G.A., Lauber,K., Lebiedziejewski,M., Schaller,M., Kyme,P., Wesselborg,S. and Autenrieth,I.B. (2005b) *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell Microbiol* 7: 91-104.

151. Kerkhoff,F.T., Bergmans,A.M., van der Zee,A. and Rothova,A. (1999) Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *J Clin Microbiol* 37: 4034-4038.

152. Keyomarsi,K. and Pardee,A.B. (1993) Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1112-1116.

153. Kietzmann,T., Cornesse,Y., Brechtel,K., Modaressi,S. and Jungermann,K. (2001) Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor alpha-subunits, HIF-1alpha, HIF-2alpha and HIF-3alpha, in rat liver. *Biochem J* 354: 531-537.

154. Kirby,J.E. and Nekorchuk,D.M. (2002) *Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4656-4661.

155. Kitamura,K., Kangawa,K., Kawamoto,M., Ichiki,Y., Nakamura,S., Matsuo,H. and Eto,T. (1993) Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 553-560.

156. Klumpp,D.J., Weiser,A.C., Sengupta,S., Forrestal,S.G., Batler,R.A. and Schäffer,A.J. (2001) Uropathogenic *Escherichia coli* potentiates type 1 pilus-induced apoptosis by suppressing NF-kappaB. *Infect Immun* 69: 6689-6695.

157. Knaus,U.G. and Bokoch,G.M. (1998) The p21Rac/Cdc42-activated kinases (PAKs). *Int J Biochem Cell Biol* 30: 857-862.

158. Koch,A.E., Polverini,P.J., Kunkel,S.L., Harlow,L.A., DiPietro,L.A., Elner,V.M., Elner,S.G. and Strieter,R.M. (1992) Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258: 1798-1801.

159. Köhler,J.E., LeBoit,P.E., Egbert,B.M. and Berger,T.G. (1988) Cutaneous vascular lesions and disseminated cat-scratch disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Ann Intern Med* 109: 449-455.

160. Köhler,J.E., Quinn,F.D., Berger,T.G., LeBoit,P.E. and Tappero,J.W. (1992) Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N Engl J Med* 327: 1625-1631.

161. Köhler,J.E. and Tappero,J.W. (1993) Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 17: 612-624.

162. Köhler,J.E., Glaser,C.A. and Tappero,J.W. (1994) *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA* 271: 531-535.

163. Köhler,J.E., Sanchez,M.A., Garrido,C.S., Whitfeld,M.J., Chen,F.M., Berger,T.G., Rodriguez-Barradas,M.C., LeBoit,P.E. and Tappero,J.W. (1997) Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N Engl J Med* 337: 1876-1883.

164. Koong,A.C., Chen,E.Y. and Giaccia,A.J. (1994) Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res* 54: 1425-1430.

165. Koong,A.C., Denko,N.C., Hudson,K.M., Schindler,C., Swiersz,L., Koch,C., Evans,S., Ibrahim,H., Le,Q.T., Terris,D.J. and Giaccia,A.J. (2000) Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res* 60: 883-887.

166. Kordick,D.L. and Breitschwerdt,E.B. (1995) Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol* 33: 1655-1656.

167. Kordick,D.L., Swaminathan,B., Greene,C.E., Wilson,K.H., Whitney,A.M., O'Connor,S., Hollis,D.G., Matar,G.M., Steigerwalt,A.G., Malcolm,G.B., Hayes,P.S., Hadfield,T.L., Breitschwerdt,E.B. and Brenner,D.J. (1996) *Bartonella vinsonii* subsp.

berkhoffii subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended description of *Bartonella vinsonii*. *Int J Syst Bacteriol* 46: 704-709.

168. Kosoy,M., Murray,M., Gilmore,R.D., Jr., Bai,Y. and Gage,K.L. (2003) *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *J Clin Microbiol* 41: 645-650.

169. Kotch,L.E., Iyer,N.V., Laughner,E. and Semenza,G.L. (1999) Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol* 209: 254-267.

170. Kumar,S., Witzig,T.E., Timm,M., Haug,J., Wellik,L., Fonseca,R., Greipp,P.R. and Rajkumar,S.V. (2003) Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. *Leukemia* 17: 2025-2031.

171. Kyme,P., Dillon,B. and Iredell,J. (2003) Phase variation in *Bartonella henselae*. *Microbiology* 149: 621-629.

172. LaCasse,E.C., Baird,S., Korneluk,R.G. and MacKenzie,A.E. (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17: 3247-3259.

173. Lachat,P., Shaw,P., Gebhard,S., van Belzen,N., Chaubert,P. and Bosman,F.T. (2002) Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues. *Histochem Cell Biol* 118: 399-408.

174. Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

175. Lal,A., Peters,H., St Croix,B., Haroon,Z.A., Dewhirst,M.W., Strausberg,R.L., Kaanders,J.H., van der Kogel,A.J. and Riggins,G.J. (2001) Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl Cancer Inst* 93: 1337-1343.

176. Lando,D., Peet,D.J., Whelan,D.A., Gorman,J.J. and Whitelaw,M.L. (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 295: 858-861.

177. LeBoit,P.E., Berger,T.G., Egbert,B.M., Beckstead,J.H., Yen,T.S. and Stoler,M.H. (1989) Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a

pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. *Am J Surg Pathol* 13: 909-920.

178. Lei,Y., Haider,H.K., Shujia,J. and Sim,E.S. (2004) Therapeutic angiogenesis. Devising new strategies based on past experiences. *Basic Res Cardiol* 99: 121-132.

179. Leonard,M.O., Cottell,D.C., Godson,C., Brady,H.R. and Taylor,C.T. (2003) The role of HIF-1alpha in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia. *J Biol Chem*.

180. Leung,D.W., Cachianes,G., Kuang,W.J., Goeddel,D.V. and Ferrara,N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309.

181. Li,J., Kartha,S., Iasvovskaia,S., Tan,A., Bhat,R.K., Manaligod,J.M., Page,K., Brasier,A.R. and Hershenson,M.B. (2002) Regulation of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L690-L699.

182. Li,Q. and Verma,I.M. (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 725-734.

183. Liberto,M.C., Matera,G., Lamberti,A.G., Barreca,G.S., Quirino,A. and Foca,A. (2003) In vitro *Bartonella quintana* infection modulates the programmed cell death and inflammatory reaction of endothelial cells. *Diagn Microbiol Infect Dis* 45: 107-115.

184. Maguina,C., Garcia,P.J., Gotuzzo,E., Cordero,L. and Spach,D.H. (2001) Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clin Infect Dis* 33: 772-779.

185. Mahon,P.C., Hirota,K. and Semenza,G.L. (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15: 2675-2686.

186. Maillard,R., Riegel,P., Barrat,F., Bouillin,C., Thibault,D., Gandoin,C., Halos,L., Demanche,C., Alliot,A., Guillot,J., Piemont,Y., Boulouis,H.J. and Vayssier-Taussat,M. (2004) *Bartonella chomelii* sp. nov., isolated from French domestic cattle (Bos taurus). *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 215-220.

187. Manders,S.M. (1996) Bacillary angiomatosis. *Clin Dermatol* 14: 295-299.

188. Marasco,W.A., Lester,S. and Parsonnet,J. (1989) Unusual presentation of cat scratch disease in a patient positive for antibody to the human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* 11: 793-803.

189. Marvin,K.W., Keelan,J.A., Eykholt,R.L., Sato,T.A. and Mitchell,M.D. (2002) Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the human amnion and choriodecidua. *Am J Obstet Gynecol* 187: 728-734.

190. Masood,R., Cai,J., Zheng,T., Smith,D.L., Naidu,Y. and Gill,P.S. (1997) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 979-984.

191. Matera,G., Liberto,M.C., Quirino,A., Barreca,G.S., Lamberti,A.G., Iannone,M., Mancuso,E., Palma,E., Cufari,F.A., Rotiroti,D. and Foca,A. (2003) *Bartonella quintana* lipopolysaccharide effects on leukocytes, CXC chemokines and apoptosis: a study on the human whole blood and a rat model. *Int Immunopharmacol* 3: 853-864.

192. Mathupala,S.P., Rempel,A. and Pedersen,P.L. (2001) Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem* 276: 43407-43412.

193. Maurin,M. and Raoult,D. (1996) *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* infections. *Clin Microbiol Rev* 9: 273-292.

194. Maurin,M., Birtles,R. and Raoult,D. (1997) Current knowledge of *Bartonella* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 487-506.

195. Maxwell,P.H., Pugh,C.W. and Ratcliffe,P.J. (2001) Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11: 293-299.

196. Maxwell,P. and Salnikow,K. (2004) HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther* 3: 29-35.

197. McCudden,C.R., James,K.A., Hasilo,C. and Wagner,G.F. (2002) Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism. *J Biol Chem* 277: 45249-45258.

198. Mecklenburgh,K.I., Walmsley,S.R., Cowburn,A.S., Wiesener,M., Reed,B.J., Upton,P.D., Deighton,J., Greening,A.P. and Chilvers,E.R. (2002) Involvement of a

ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis. *Blood* 100: 3008-3016.

199. Metzen,E., Berchner-Pfannschmidt,U., Stengel,P., Marxsen,J.H., Stolze,I., Klinger,M., Huang,W.Q., Wotzlaw,C., Hellwig-Burgel,T., Jelkmann,W., Acker,H. and Fandrey,J. (2003) Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116: 1319-1326.

200. Milam,M.W., Balerdi,M.J., Toney,J.F., Foulis,P.R., Milam,C.P. and Behnke,R.H. (1990) Epithelioid angiomatosis secondary to disseminated cat scratch disease involving the bone marrow and skin in a patient with acquired immune deficiency syndrome: a case report. *Am J Med* 88: 180-183.

201. Miller,B.S. and Zandi,E. (2001) Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem* 276: 36320-36326.

202. Monack,D.M., Raupach,B., Hromockyj,A.E. and Falkow,S. (1996) *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9833-9838.

203. Monteil,R.A., Michiels,J.F., Hofman,P., Saint,P.M., Hitzig,C., Perrin,C. and Santini,J. (1994) Histological and ultrastructural study of one case of oral bacillary angiomatosis in HIV disease and review of the literature. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 30B: 65-71.

204. Moore,E.E., Küstner,R.E., Conklin,D.C., Whitmore,T.E., Downey,W., Buddle,M.M., Adams,R.L., Bell,L.A., Thompson,D.L., Wolf,A., Chen,L., Stamm,M.R., Grant,F.J., Lok,S., Ren,H. and De Jongh,K.S. (1999) Stanniocalcin 2: characterization of the protein and its localization to human pancreatic alpha cells. *Horm Metab Res* 31: 406-414.

205. Morii,K., Tanaka,R., Washiyama,K., Kumanishi,T. and Kuwano,R. (1993) Expression of vascular endothelial growth factor in capillary hemangioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 749-755.

206. Motohashi,H., Shavit,J.A., Igarashi,K., Yamamoto,M. and Engel,J.D. (1997) The world according to Maf. *Nucleic Acids Res* 25: 2953-2959.

207. Mukaida,N. and Murayama,T. (1998) Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *Rinsho Byori* 46: 821-828.

208. Nakamura,S., Salahuddin,S.Z., Biberfeld,P., Ensoli,B., Markham,P.D., Wong-Staal,F. and Gallo,R.C. (1988) Kaposi's sarcoma cells: long-term culture with growth factor from retrovirus-infected CD4+ T cells. *Science* 242: 426-430.

209. Naranatt,P.P., Krishnan,H.H., Svojanovsky,S.R., Bloomer,C., Mathur,S. and Chandran,B. (2004) Host gene induction and transcriptional reprogramming in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8)-infected endothelial, fibroblast, and B cells: insights into modulation events early during infection. *Cancer Res* 64: 72-84.

210. Navarre,W.W. and Zychlinsky,A. (2000) Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol* 2: 265-273.

211. Öhler,M.K., Hague,S., Rees,M.C. and Bicknell,R. (2002) Adrenomedullin promotes formation of xenografted endometrial tumors by stimulation of autocrine growth and angiogenesis. *Oncogene* 21: 2815-2821.

212. Ogawa,K., Pasqualini,R., Lindberg,R.A., Kain,R., Freeman,A.L. and Pasquale,E.B. (2000) The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene* 19: 6043-6052.

213. O'Hagan,R.C., Schreiber-Agus,N., Chen,K., David,G., Engelman,J.A., Schwab,R., Alland,L., Thomson,C., Ronning,D.R., Sacchettini,J.C., Meltzer,P. and DePinho,R.A. (2000) Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nat Genet* 24: 113-119.

214. Ono,M., Torisu,H., Fukushi,J., Nishie,A. and Kuwano,M. (1999) Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol* 43 Suppl: S69-S71.

215. Padmalayam,I., Karem,K., Baumstark,B. and Massung,R. (2000) The gene encoding the 17-kDa antigen of *Bartonella henselae* is located within a cluster of genes homologous to the *virB* virulence operon. *DNA Cell Biol* 19: 377-382.

216. Pagliari,L.J., Perlman,H., Liu,H. and Pope,R.M. (2000) Macrophages require constitutive NF-kappaB activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis. *Mol Cell Biol* 20: 8855-8865.

217. Pahl,H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866.

218. Pandey,A., Shao,H., Marks,R.M., Polverini,P.J. and Dixit,V.M. (1995) Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF-alpha-induced angiogenesis. *Science* 268: 567-569.

219. Park,S.Y., Kelminson,K.L., Lee,A.K., Zhang,P., Warner,R.E., Rehkopf,D.H., Calderwood,S.B. and Köhler,J.E. (2001) Identification, characterization, and functional analysis of a gene encoding the ferric uptake regulation protein in *Bartonella* species. *J Bacteriol* 183: 5751-5755.

220. Peng,J., Zhang,L., Drysdale,L. and Fong,G.H. (2000) The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8386-8391.

221. Perez,R., Wu,N., Klipfel,A.A. and Beart,R.W.Jr. (2003) A better cell cycle target for gene therapy of colorectal cancer: cyclin G. *J Gastrointest Surg* 7: 884-889.

222. Pilegaard,H., Keller,C., Steensberg,A., Helge,J.W., Pedersen,B.K., Saltin,B. and Neufer,P.D. (2002) Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. *J Physiol* 541: 261-271.

223. Popovici,R.M., Lu,M., Bhatia,S., Faessen,G.H., Giaccia,A.J. and Giudice,L.C. (2001) Hypoxia regulates insulin-like growth factor-binding protein 1 in human fetal hepatocytes in primary culture: suggestive molecular mechanisms for in utero fetal growth restriction caused by uteroplacental insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2653-2659.

224. Pridmore,A.C., Wyllie,D.H., Abdillahi,F., Steeghs,L., van der Ley.P., Dower,S.K. and Read,R.C. (2001) A lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via toll-like receptor (TLR) 2 but not via TLR4/MD2. *J Infect Dis* 183: 89-96.

225. Pugh,C.W. and Ratcliffe,P.J. (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9: 677-684.

226. Rajalingam,K., Al Younes,H., Müller,A., Meyer,T.F., Szczepek,A.J. and Rudel,T. (2001) Epithelial cells infected with *Chlamydophila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*) are resistant to apoptosis. *Infect Immun* 69: 7880-7888.

227. Reimer,C.L., Borras,A.M., Kurdistani,S.K., Garreau,J.R., Chung,M., Aaronson,S.A. and Lee,S.W. (1999) Altered regulation of cyclin G in human breast cancer and its specific localization at replication foci in response to DNA damage in p53+/+ cells. *J Biol Chem* 274: 11022-11029.

228. Regnery,R., Martin,M. and Olson,J. (1992a) Naturally occurring "*Rochalimaea henselae*" infection in domestic cat. *Lancet* 340: 557-558.

229. Regnery,R.L., Anderson,B.E., Clarridge,J.E., Rodriguez,B.M., Jones,D.C. and Carr,J.H. (1992b) Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 30: 265-274.

230. Rehman,J., Li,J., Orschell,C.M. and March,K.L. (2003) Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107: 1164-1169.

231. Relman,D.A., Loutit,J.S., Schmidt,T.M., Falkow,S. and Tompkins,L.S. (1990) The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 323: 1573-1580.

232. Relman,D.A., Falkow,S., LeBoit,P.E., Perkocha,L.A., Min,K.W., Welch,D.F. and Slater,L.N. (1991) The organism causing bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, and fever and bacteremia in immunocompromised patients. *N Engl J Med* 324: 1514.

233. Resto-Ruiz,S.I., Schmiederer,M., Sweger,D., Newton,C., Klein,T.W., Friedman,H. and Anderson,B.E. (2002) Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* 70: 4564-4570.

234. Richard,D.E., Berra,E., Gothie,E., Roux,D. and Pouyssegur,J. (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 274: 32631-32637.

235. Ricort,J.M. and Binoux,M. (2004) Insulin-like growth factor binding protein-3 stimulates phosphatidylinositol 3-kinase in MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 1044-1049.

236. Riess,T., Anderson,B., Fackelmayer,A., Autenrieth,I.B. and Kempf,V.A. (2003) Rapid and efficient transposon mutagenesis of *Bartonella henselae* by transposome technology. *Gene* 313: 103-109.

237. Riess,T., Andersson,S.G., Lupas,A., Schaller,M., Schäfer,A., Kyme,P., Martin,J., Wälzlein,J.H., Ehehalt,U., Lindroos,H., Schirle,M., Nordheim,A., Autenrieth,I.B. and Kempf,V.A. (2004) *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* 200: 1267-1278.

238. Risau,W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674.

239. Roggenkamp,A., Ruckdeschel,K., Leitritz,L., Schmitt,R. and Heesemann,J. (1996) Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* 64: 2506-2514.

240. Rolain,J.M., La,S.B., Liang,Z., Davoust,B. and Raoult,D. (2001) Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *J Clin Microbiol* 39: 2978-2980.

241. Rolain,J.M., Brouqui,P., Koehler,J.E., Maguina,C., Dolan,M.J. and Raoult,D. (2004) Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1921-1933.

242. Rothwarf,D.M., Zandi,E., Natoli,G. and Karin,M. (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* 395: 297-300.

243. Ruckdeschel,K., Roggenkamp,A., Lafont,V., Mangeat,P., Heesemann,J. and Rouot,B. (1997) Interaction of *Yersinia enterocolitica* with macrophages leads to macrophage cell death through apoptosis. *Infect Immun* 65: 4813-4821.

244. Ruckdeschel,K., Harb,S., Roggenkamp,A., Hornef,M., Zumbihl,R., Kohler,S., Heesemann,J. and Rouot,B. (1998) *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 187: 1069-1079.

245. Ryan,H.E., Lo,J. and Johnson,R.S. (1998) HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 17: 3005-3015.

246. Salahuddin,S.Z., Nakamura,S., Biberfeld,P., Kaplan,M.H., Markham,P.D., Larsson,L. and Gallo,R.C. (1988) Angiogenic properties of Kaposi's sarcoma-derived cells after long-term culture in vitro. *Science* 242: 430-433.

247. Salani,D., Taraboletti,G., Rosano,L., Di,C., V, Borsotti,P., Giavazzi,R. and Bagnato,A. (2000) Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol* 157: 1703-1711.

248. Salnikow,K., Blagosklonny,M.V., Ryan,H., Johnson,R. and Costa,M. (2000) Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Res* 60: 38-41.

249. Sander,A., Kretzer,S., Bredt,W., Oberle,K. and Bereswill,S. (2000) Hemin-dependent growth and hemin binding of *Bartonella henselae*. *FEMS Microbiol Lett* 189: 55-59.

250. Scadden,D.T. (2003) AIDS-related malignancies. *Annu Rev Med* 54: 285-303.

251. Schmid,M.C., Bisoffi,M., Wetterwald,A., Gautschi,E., Thalmann,G.N., Mitola,S., Bussolino,F. and Cecchini,M.G. (2003) Insulin-like growth factor binding protein-3 is overexpressed in endothelial cells of mouse breast tumor vessels. *Int J Cancer* 103: 577-586.

252. Schmid,M.C., Schulein,R., Dehio,M., Denecker,G., Carena,I. and Dehio,C. (2004) The *VirB* type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion,

proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol Microbiol* 52: 81-92.

253. Schmiederer,M. and Anderson,B. (2000) Cloning, sequencing, and expression of three *Bartonella henselae* genes homologous to the *Agrobacterium tumefaciens VirB* region. *DNA Cell Biol* 19: 141-147.

254. Schneider,T., Ullrich,R., Schmitt-Graff,A., Bergs,C., Reiterer,L., Dissmann,T., Zeitz,M. and Riecken,E.O. (1993) Bacillary angiomatosis in a German patient with AIDS. *Clin Investig* 72: 50-54.

255. Schulein,R. and Dehio,C. (2002) The *VirB/VirD4* type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol Microbiol* 46: 1053-1067.

256. Schulein,R., Guye,P., Rhomberg,T.A., Schmid,M.C., Schroder,G., Vergunst,A.C., Carena,I. and Dehio,C. (2005) A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 856-861.

257. Schulte,R., Wattiau,P., Hartland,E.L., Robins-Browne,R.M. and Cornelis,G.R. (1996) Differential secretion of interleukin-8 by human epithelial cell lines upon entry of virulent or nonvirulent *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 64: 2106-2113.

258. Schulte,R., Zumbihl,R., Kampik,D., Fauconnier,A. and Autenrieth,I.B. (1998) Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 187: 53-60.

259. Schulze-Koops,H., Burkhardt,H., Heesemann,J., von der Mark,K. and Emmrich,F. (1992) Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *yersiniae* to various types of collagen. *Infect Immun* 60: 2153-2159.

260. Semenza,G.L. (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8: 588-594.

261. Semenza,G.L. (2000a) Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res* 1: 159-162.

262. Semenza,G.L. (2000b) HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev* 14: 1983-1991.

263. Semenza,G.L. (2000c) Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 71-103

264. Semenza,G.L. (2001a) HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 107: 1-3.

265. Semenza,G.L. (2001b) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 7: 345-350.

266. Seth,P., Krop,I., Porter,D. and Polyak,K. (2002) Novel estrogen and tamoxifen induced genes identified by SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). *Oncogene* 21: 836-843.

267. Seubert,A., Schulein,R. and Dehio,C. (2002) Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of *Bartonella* spp. *Int J Med Microbiol* 291: 555-560.

268. Seubert,A., Hiestand,R., de la Cruz,F. and Dehio,C. (2003) A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol* 49: 1253-1266.

269. Sharma,A. and Qadri,A. (2004) Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

270. Shibuya,M. (2003) Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 94: 751-756.

271. Shoshani,T., Faerman,A., Mett,I., Zelin,E., Tenne,T., Gorodin,S., Moshel,Y., Elbaz,S., Budanov,A., Chajut,A., Kalinski,H., Kamer,I., Rozen,A., Mor,O., Keshet,E., Leshkowitz,D., Einat,P., Skaliter,R. and Feinstein,E. (2002) Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 22: 2283-2293.

272. Slater,L.N., Welch,D.F., Hensel,D. and Coody,D.W. (1990) A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med* 323: 1587-1593.

273. Slater,L.N., Welch,D.F. and Min,K.W. (1992) *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. *Arch Intern Med* 152: 602-606.

274. Skotzko,M., Wu,L., Anderson,W.F., Gordon,E.M. and Hall,F.L. (1995) Retroviral vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1 (CYCG1) inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells. *Cancer Res* 55: 5493-5498.

275. Smit,M.J., Verzijl,D., Casarosa,P., Navis,M., Timmerman,H. and Leurs,R. (2002) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor ORF74 constitutively activates p44/p42 MAPK and Akt via G(i) and phospholipase C-dependent signaling pathways. *J Virol* 76: 1744-1752.

276. Sodhi,A., Montaner,S., Patel,V., Zohar,M., Bais,C., Mesri,E.A. and Gutkind,J.S. (2000) The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res* 60: 4873-4880.

277. Stehlik,C., de Martin,R., Kumabashiri,I., Schmid,J.A., Binder,B.R. and Lipp,J. (1998) Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med* 188: 211-216.

278. Strieter,R.M., Kunkel,S.L., Elner,V.M., Martonyi,C.L., Koch,A.E., Polverini,P.J. and Elner,S.G. (1992) Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol* 141: 1279-1284.

279. Sunderkotter,C., Steinbrink,K., Goebeler,M., Bhardwaj,R. and Sorg,C. (1994) Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55: 410-422.

280. Sutter,C.H., Laughner,E. and Semenza,G.L. (2000) Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4748-4753.

281. Talks,K.L., Turley,H., Gatter,K.C., Maxwell,P.H., Pugh,C.W., Ratcliffe,P.J. and Harris,A.L. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157: 411-421.

282. Teodoro,J.G. and Branton,P.E. (1997) Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 71: 1739-1746.

283. Tian,H., McKnight,S.L. and Russell,D.W. (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11: 72-82.

284. Tian,H., Hammer,R.E., Matsumoto,A.M., Russell,D.W. and McKnight,S.L. (1998) The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 12: 3320-3324.

285. Towbin,H., Staehelin,T. and Gordon,J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24: 145-149.

286. Verma,A. and Ihler,G.M. (2002) Activation of Rac, Cdc42 and other downstream signalling molecules by *Bartonella bacilliformis* during entry into human endothelial cells. *Cell Microbiol* 4: 557-569.

287. Vieira,J., O'Hearn,P., Kimball,L., Chandran,B. and Corey,L. (2001) Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human cytomegalovirus. *J Virol* 75: 1378-1386.

288. Voll,R.E., Herrmann,M., Roth,E.A., Stach,C., Kalden,J.R. and Girkontaite,I. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390: 350-351.

289. Wainger,B.J., DeGennaro,M., Santoro,B., Siegelbaum,S.A. and Tibbs,G.R. (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411: 805-810.

290. Waldvogel,K., Regnery,R.L., Anderson,B.E., Caduff,R., Caduff,J. and Nadal,D. (1994) Disseminated cat-scratch disease: detection of *Rochalimaea henselae* in affected tissue. *Eur J Pediatr* 153: 23-27.

291. Wang,G.L., Jiang,B.H., Rue,E.A. and Semenza,G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5510-5514.

292. Weinberg,E.D. (1978) Iron and infection. *Microbiol Rev* 42: 45-66.

293. Weinstat-Saslow,D., Merino,M.J., Manrow,R.E., Lawrence,J.A., Bluth,R.F., Wittenbel,K.D., Simpson,J.F., Page,D.L. and Steeg,P.S. (1995) Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions. *Nat Med* 1: 1257-1260.

294. Welch,D.F., Pickett,D.A., Slater,L.N., Steigerwalt,A.G. and Brenner,D.J. (1992) *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J Clin Microbiol* 30: 275-280.

295. Wellmann,S., Taube,T., Paal,K., Graf,V.E., Geilen,W., Seifert,G., Eckert,C., Henze,G. and Seeger,K. (2001) Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin Chem* 47: 654-660.

296. Wenger,R.H. (2000) Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 203 Pt 8: 1253-1263.

297. Wenger,R.H. (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression. *FASEB J* 16: 1151-1162.

298. Wiesener,M.S., Turley,H., Allen,W.E., Willam,C., Eckardt,K.U., Talks,K.L., Wood,S.M., Gatter,K.C., Harris,A.L., Pugh,C.W., Ratcliffe,P.J. and Maxwell,P.H. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 92: 2260-2268.

299. Winzen,R., Gowrishankar,G., Bollig,F., Redich,N., Resch,K. and Holtmann,H. (2004) Distinct domains of AU-rich elements exert different functions in mRNA destabilization and stabilization by p38 mitogen-activated protein kinase or HuR. *Mol Cell Biol* 24: 4835-4847.

300. Woo,K.M., Kim,K.I., Goldberg,A.L., Ha,D.B. and Chung,C.H. (1992) The heat-shock protein ClpB in *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase. *J Biol Chem* 267: 20429-20434.

301. Xu,L., Pathak,P.S. and Fukumura,D. (2004) Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 10: 701-707.

302. Yamane,A., Seetharam,L., Yamaguchi,S., Gotoh,N., Takahashi,T., Neufeld,G. and Shibuya,M. (1994) A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene* 9: 2683-2690.

303. Yancopoulos,G.D., Klagsbrun,M. and Folkman,J. (1998) Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 93: 661-664.

304. Yancopoulos,G.D., Davis,S., Gale,N.W., Rudge,J.S., Wiegand,S.J. and Holash,J. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248.

305. Yasuda,S., Arii,S., Mori,A., Isobe,N., Yang,W., Oe,H., Fujimoto,A., Yonenaga,Y., Sakashita,H. and Imamura,M. (2004) Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance. *J Hepatol* 40: 117-123.

306. Zähringer,U., Lindner,B., Knirel,Y.A., Van Den Akker,W.M., Hiestand,R., Heine,H. and Dehio,C. (2004) Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *J Biol Chem*.

307. Zbinden,R., Hochli,M. and Nadal,D. (1995) Intracellular location of *Bartonella henselae* cocultivated with Vero cells and used for an indirect fluorescent-antibody test. *Clin Diagn Lab Immunol* 2: 693-695.

308. Zeng,H., Dvorak,H.F. and Mukhopadhyay,D. (2001) Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 276: 26969-26979.

309. Zeng,H., Zhao,D., Yang,S., Datta,K. and Mukhopadhyay,D. (2003) Heterotrimeric G alpha q/G alpha 11 proteins function upstream of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (KDR) phosphorylation in vascular permeability factor/VEGF signaling. *J Biol Chem* 278: 20738-20745.

310. Zhong,H., Chiles,K., Feldser,D., Laughner,E., Hanrahan,C., Georgescu,M.M., Simons,J.W. and Semenza,G.L. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60: 1541-1545.

311. Zimmermann,R., Kempf,V.A., Schiltz,E., Oberle,K. and Sander,A. (2003) Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from *Bartonella henselae*. *J Bacteriol* 185: 1739-1744.

312. Zink,S.D., Pedersen,L., Cianciotto,N.P. and Abu-Kwaik,Y. (2002) The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect Immun* 70: 1657-1663.

313. Zlot,C., Ingle,G., Hongo,J., Yang,S., Sheng,Z., Schwall,R., Paoni,N., Wang,F., Peale,F.V.Jr. and Gerritsen,M.E. (2003) Stanniocalcin 1 is an autocrine modulator of endothelial angiogenic responses to hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 278: 47654-47659.

314. Zychlinsky,A., Thirumalai,K., Arondel,J., Cantey,J.R., Aliprantis,A.O. and Sansonetti,P.J. (1996) In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect Immun* 64: 5357-5365.

315. Zychlinsky,A. and Sansonetti,P. (1997) Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J Clin Invest* 100: 493-495.

7. Abkürzungen

A.	*Agrobacterium*
AA/BA	Acrylamid / Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
Act. D	Actinomycin D
ad	lat.: bis
ADM	Adrenomedullin
AIDS	*Acquired Immuno Deficiency Syndrome*
Akt	Protein Kinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
B.	*Bartonella*
BA	bazilläre Angiomatose
BadA	*Bartonella* Adhäsin A
Bep	*Bartonella*-transloziertes Effektorprotein
BHI	*brain-heart-infusion*-Medium
bp	Basenpaare
BPH	bazilläre Peliosis Hepatis
BSA	*bovine serum albumin*
bzw.	Beziehungsweise
C.	*Chlamydia*
ca.	circa
CCNG2	Zyklin G2
cDNA	*copy* DNA
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Ct	*Threshold Cycle*
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole-2HCl
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DFO	Desferrioxamin
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	*desoxyribonucleic acid*

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.	*Escherichia*
ECL	*enhanced chemo luminescence*
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EFNA1	Ephrin A1
EGF	*epidermal growth factor*
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
EMSA	*electrophoretic mobility shift assay*
ENO2	Enolase 2
ERK	*extracellular-signal-regulated kinase*
ET-2	Endothelin-2
et al.	*et alii* (lat.: und andere)
etc.	*et cetera* (lat.: und so weiter)
EFZ	Effektorzellen
ERK	*extracellular signal-regulated kinase*
EZ	Endothelzellen
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	*fetal calf serum*
Fe	Eisen
FIH	*factor inhibiting HIF*
Fur	*ferric uptake regulation protein*
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Gln	Glutamin
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HHV	Humanes Herpes Virus
HIF	*hypoxia-inducible factor*
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
HK2	Hexokinase 2
H_2O	Wasser
$H_2O_{dest.}$	einfach destilliertes Wasser

$H_2O_{bidest.}$	zweifach destilliertes Wasser
H_2O_2	Waserstoffperoxid
HMEC-1	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HRE	*hypoxia responsive element*
HRP	*horse radish peroxidase*
HUVEC	*human umbilical vein endothelial cell*
ICAM-1	*intracellular adhesion molecule*-1
IGFBP-3	*insulin-like growth factor binding protein-3*
IHC	Immunhistochemie
IKK	IκB-Kinase
IκB	Inhibitor κB
IL	Interleukin
inv.	Invasin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
JNK	*c-Jun N-terminal kinase*
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KKK	Katzenkratzkrankheit
KS	Kaposi Sarkom
KSHV	*Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*
l	Liter
L.	*Legionella*
L.	*Listeria*
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol/l
mA	Milliampere
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MEK	*mitogen-activated ERK-activating kinase*
min	Minute
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
µl	Mikroliter

µm	Mikrometer
MOI	*multiplicity of infection*
mRNA	*messenger* RNA
NF-κB	*nuclear factor*-κB
nm	Nanometer
O_2	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ODD	sauerstoff-abhängige Degradierungs-Domäne
OMP	*outer membrane protein*
ORF	*open reading frame*
PAS	*basic helix-loop-helix-Per/ARNT/sim*
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PDGF	*platelet-derived growth factor*
PHD	Prolylhydroxylase
PI3	Phosphatidylinositol 3
PlGF	*placental growth factor*
PMA	Phorbol-12 Myristat-13-Azetat
PMN	polymorphonukleärer Leukozyt
PMSF	Phenylmethansulfon-Säurefluorid
PNPP	P-Nitrophenyl-Phosphat
P/S	Penicillin / Streptomycin
PTEN	*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*
PVDF	Polyvenylidenfluorid
pVHL	von Hippel Lindau
Raf	*Ras regulated serine/threonine protein kinase*
Ras	*Ras superfamily of small guanosin triphosphatases*
rh	*recombinant human*
RIA	*radio immuno assay*
RISC	*si*RNA-induzierter *silencing* Komplex
RNA	*ribonucleic acid*
RNase	Ribonuklease
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
rRNA	*ribosomal ribonucleic acid*

RT	reverse Transkriptase
S.	*Salmonella*
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
*si*RNA	*small interfering RNA*
SI	Stimulationsindex
spp.	*spezies* (lat.: Arten)
STC-2	Stanniocalcin-2
subsp.	*Subspezies* (lat. Unterarten)
Tab.	Tabelle
TAD	N-terminale Transaktivierungsdomäne
Taq	*Termophilus aquaticus*
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TGF	*transforming growth factor*
TM	TaqMan-Sonde
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin-Isocyanat
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
V	Volt
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VE	voll entsalzt
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
vgl.	Vergleich
v/v	Volumen pro Volumen
Y.	*Yersinia*
YadA	*Yersinia* Adhäsin A
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8. Anhang

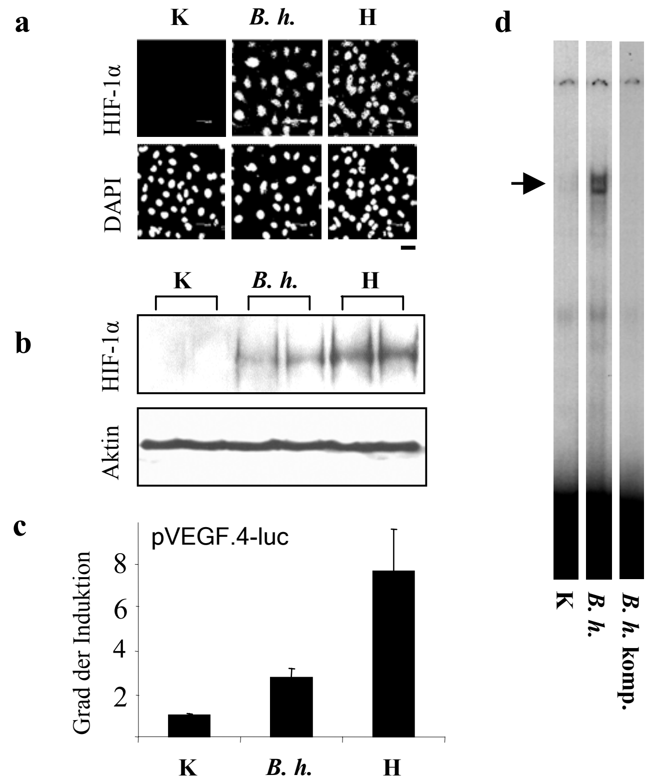


Abb. 27: Aktivierung von HIF-1α in *B. henselae*-infizierten Hela-Zellen. **(a)** Detektion von HIF-1α mittels Immunfluoreszenzfärbung. Die Zellen wurden 3 h mit *B. henselae* (MOI 500) kokultiviert und anschließend mit einem anti-HIF-1α Primär- und einem TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (obere Reihe). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (untere Reihe). K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, H: Hypoxie (Positivkontrolle), Skalierung: 20 µm. **(b)** Nachweis der HIF-1α-Aktivierung mittels Western Blot. HeLa-Zellen wurden *mit B. henselae* (MOI 250) infiziert und nach 6 h lysiert. Die Gesamtzell-Lysate wurden mittels Western Blot analysiert (anti-HIF-1α: 1:1000). Die Negativkontrolle bestand aus nicht-infizierten Zellen, die Positivkontrolle aus Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Um zu gewährleisten, dass sich in allen Gesamtzell-Lysaten gleichviel Protein befindet, wurde als interne Kontrolle ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das *house keeping gene* β-Aktin durchgeführt, das konstitutiv exprimiert wird. K: nivht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, H: Hypoxie (Positivkontrolle) **(c)** Analyse der HIF-1 Aktivierung anhand von Reportergenassays. HeLa-Zellen wurden 24 h vor Infektion mit *B. henselae* (MOI 500) mit 0,5 µg pVEGF.4 transfiziert. Messung der Luziferase-Aktivität 36 h nach Infektion mittels Chemilumineszenz. Die Werte wurden mit dem konstitutiv exprimierten Gen β-Galaktosidase und den vorliegenden Proteinmengen (Bestimmung mittels Bradford) abgeglichen. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, H: Hypoxie (Positivkontrolle) **(d)** Analyse der Induktion von HIF-1 über EMSA. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 500) infiziert. Die Kernextrakte wurden 3 h nach Infektion hergestellt. Die Extrakte wurden mit einer radioaktiv-markierten Sonde (30000 counts/min pro Spur) markiert. Die DNA-Bindung wurde auf einem Röntgenfilm detektiert. Im Kompetitionsansatz wurden die Kernextrakte, der mit *B. henselae* infizierten Zellen, in Anwesenheit eines 100-fachen Überschusses an unmarkierten Oligonukleotiden inkubiert. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, *B. h.* komp.: *B. henselae* Kompetitionsansatz; [entnommen aus: **Kempf, V.A.; Lebiedziejewski, M.; Alitalo, K.; Wälzlein, J.H.; Ehehalt, U.; Fiebig, J.; Schütt, B.; Sander, C.; Müller, S.; Grassl, G.; Brehm, B.; Autenrieth, I.B. (2005)** Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacillary Angiomatosis. Evidence for a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacterial Infections. *Circulation* **111**: 1054-1062].

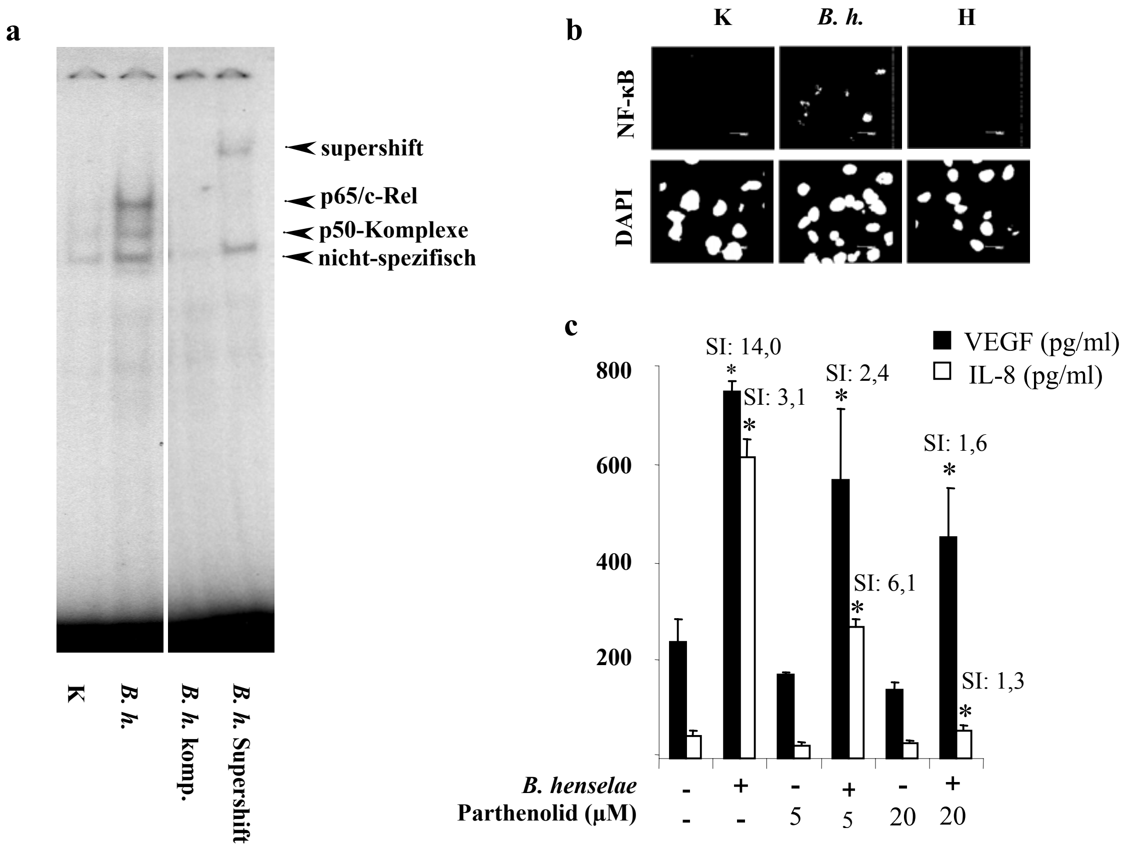


Abb. 28: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB nach *B. henselae*-Infektion von HeLa-Zellen. **(a)** Detektion der NF-κB-Aktivität mittels EMSA. Die Kernextrakte wurden 2 h nach *B. henselae*-Infektion (MOI 500) hergestellt. Die Extrakte wurden mit einer radioaktiv-markierten Sonde (30000 counts/min pro Spur) markiert. Die DNA-Bindung wurde auf einem Röntgenfilm detektiert. Im Kompetitionsansatz wurden die Kernextrakte, der mit *B. henselae*-infizierten Zellen, mit der radioaktiv-markierten NF-κB-Sonde unter Anwesenheit eines 100-fachen Überschusses an unmarkierten Oligonukleotiden inkubiert. Zur Erzeugung des Supershifts wurde der Antikörper anti-p50 eingesetzt. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, *B. h.* komp.: *B. henselae* Kompetitionsansatz**,** *B. h.* Supershift: *B. henselae* Supershift-Ansatz **(b)** Aktivierung von NF-κB in *B. henselae*-infizierten HeLa-Zellen. Detektion mittels Immunfluoreszenzfärbung. Die Zellen wurden 3 h mit *B. henselae* kokultiviert (MOI 500) und anschließend mit einem anti-NF-κB Primär- und einem TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (obere Reihe). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (untere Reihe). K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, H: Hypoxie (Positivkontrolle), Skalierung: 20 µm. **(c)** Vergleich der VEGF- und IL-8 Sekretion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae* unter Anwesenheit des NF-κB-Inhibitors Parthenolid. Die Zytokinkonzentration im Zellüberstand wurde mittels ELISA (72 h nach Infektion) gemessen. Eine halbe Stunde vor Infektion mit *B. henselae* (MOI 250) wurden die HeLa-Zellen mit Parthenolid (5 µM, 20 µM) inkubiert. Die Zellen blieben während des gesamten Versuchs der Inhibitorkonzentration ausgesetzt. SI: Stimulationsindex, *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Negativkontrolle; [Abb. 28 (a), (c) entnommen aus: **Kempf, V.A.; Lebiedziejewski, M.; Alitalo, K.; Wälzlein, J.H.; Ehehalt, U.; Fiebig, J.; Schütt, B.; Sander, C.; Müller, S.; Grassl, G.; Brehm, B.; Autenrieth, I.B. (2005)** Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacillary Angiomatosis. Evidence for a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacterial Infections. *Circulation* **111**: 1054-1062, 28 (b) entnommen aus der Diplomarbeit: **Wälzlein,J.H.** (2003) Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) durch *Bartonella henselae*.].

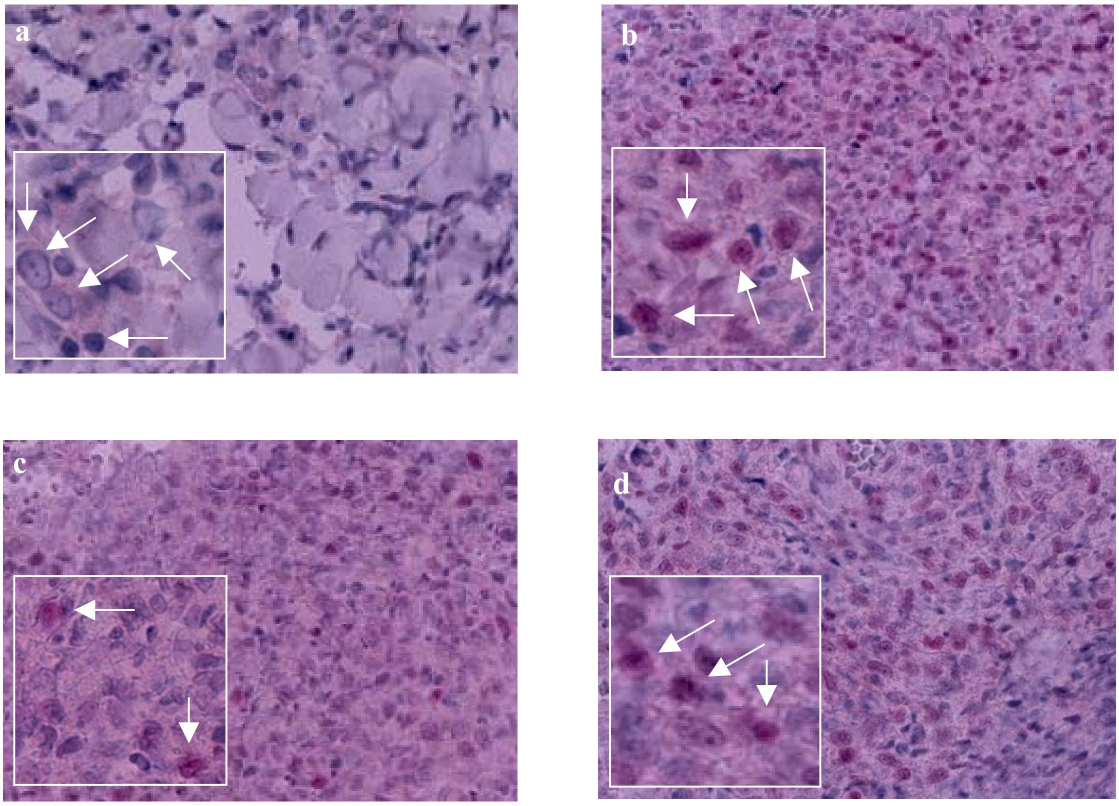


Abb. 29: Aktivierung von HIF-1α in Biopsaten von Patienten mit Bazillärer Angiomatose (BA). Immunhistochemischer Nachweis von HIF-1α in normaler Haut (a) und drei Biopsaten von BA-Patienten (b-d) unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers (rot). HIF-1α liegt nukleär lokalisiert vor (siehe Pfeile); [entnommen aus: **Kempf, V.A.; Lebiedziejewski, M.; Alitalo, K.; Wälzlein, J.H.; Ehehalt, U.; Fiebig, J.; Schütt, B.; Sander, C.; Müller, S.; Grassl, G.; Brehm, B.; Autenrieth, I.B. (2005)** Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacillary Angiomatosis. Evidence for a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacterial Infections. *Circulation* **111**: 1054-1062].

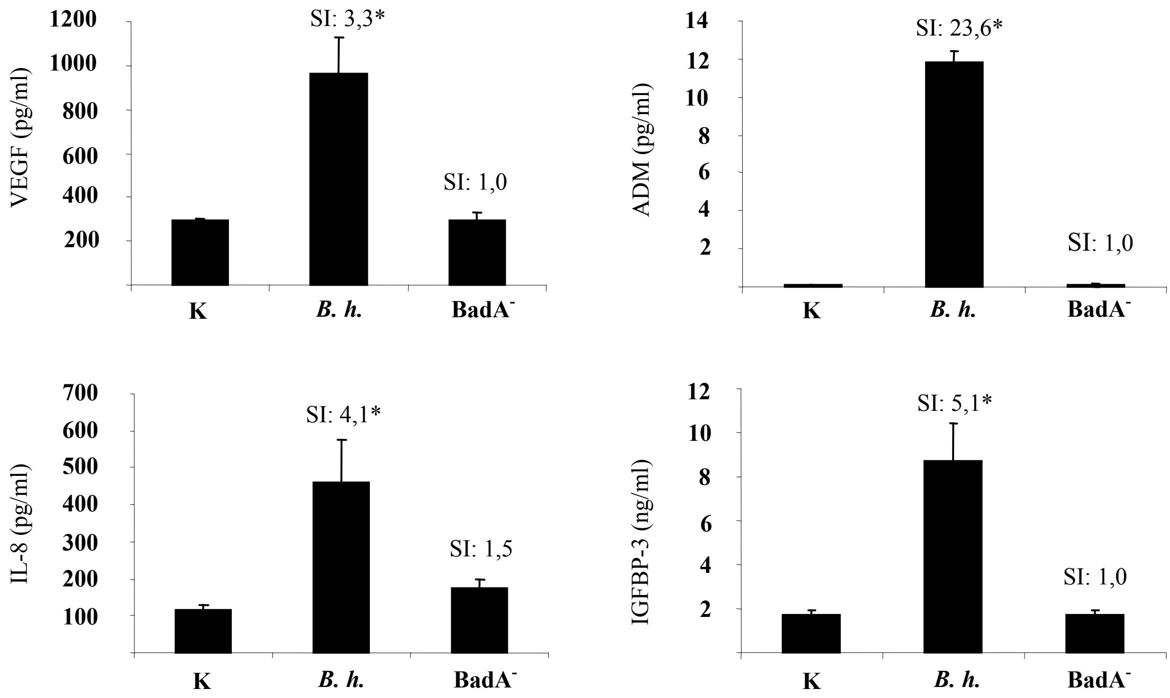


Abb. 30: Zytokin-Sekretion nach Infektion mit *B. henselae* Wildtyp und *B. henselae* BadA$^-$. Messung der Zytokin-Konzentration mittels ELISA (VEGF, IL-8) und RIA (ADM, IGFBP-3). HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae*-Wildtyp und *B. henselae* BadA$^-$ (beide MOI: 250) infiziert. Die Zellkulturüberstände wurden nach 72 h abgenommen. ADM- und IGFBP-3-RIA wurden in Kooperation mit Dr. Burkhardt Schütt (Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen) durchgeführt. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, BadA$^-$: *B. henselae* BadA$^-$-infizierte Zellen, SI: Stimulationsindex, ∗: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle; [entnommen aus der Doktorarbeit: **Ehehalt,U.** (2004) Aktivierung von Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) und Induktion proangiogenetischer Zytokine nach Infektion mit *Bartonella henselae*.].

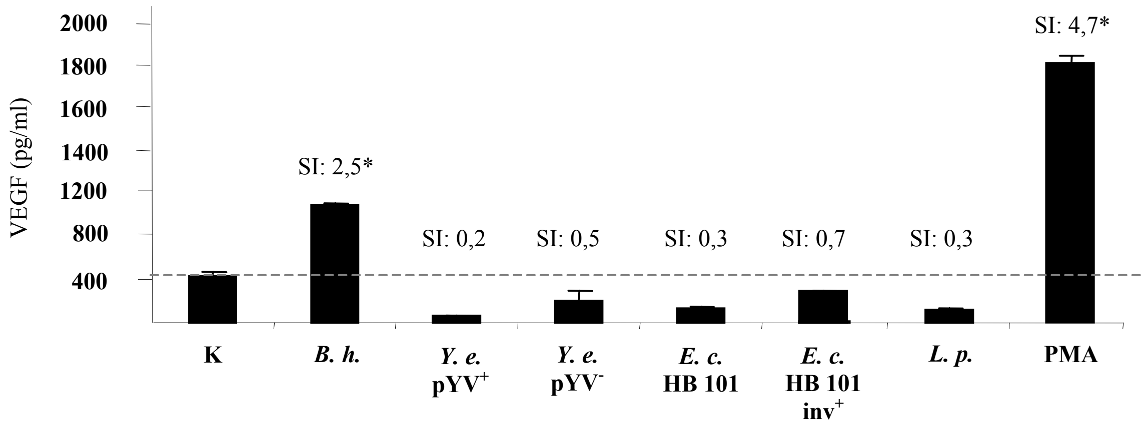


Abb. 31: VEGF-Sekretion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae, Y. enterocolitica, E. coli* und *L. pneumophila*. Messung der VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA (72 h nach Infektion). HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250), *Y. enterocolitica* pYV^+, *Y. enterocolitica* pYV^- (beide MOI 20), *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv^+ (beide MOI 100) und *L. pneumophila* (MOI 100) infiziert. Die Positivkontrolle bestand aus PMA (25 ng/ml). SI: Stimulationsindex, *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle; [entnommen aus der Doktorarbeit: **Ehehalt,U.** (2004) Aktivierung von Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) und Induktion proangiogenetischer Zytokine nach Infektion mit *Bartonella henselae*.].

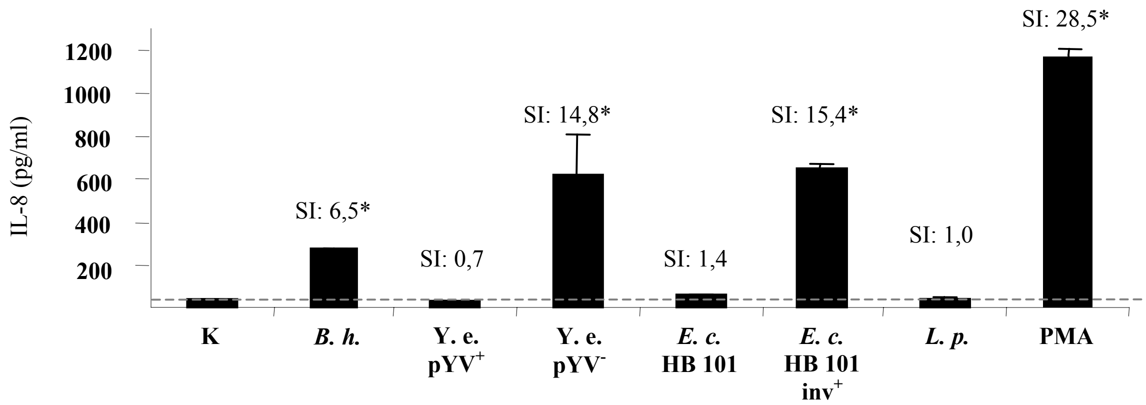


Abb. 32: IL-8-Sekretion von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae, Y. enterocolitica, E. coli* und *L. pneumophila*. Messung der IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA (72 h nach Infektion). HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250), *Y. enterocolitica* pYV^+, *Y. enterocolitica* pYV^- (beide MOI 20), *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv^+ (beide MOI 100) und *L. pneumophila* (MOI 100) infiziert. Die Positivkontrolle bestand aus PMA (25 ng/ml). SI: Stimulationsindex, *: statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zur Negativkontrolle; [entnommen aus der Doktorarbeit: **Ehehalt,U.** (2004) Aktivierung von Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) und Induktion proangiogenetischer Zytokine nach Infektion mit *Bartonella henselae*.].

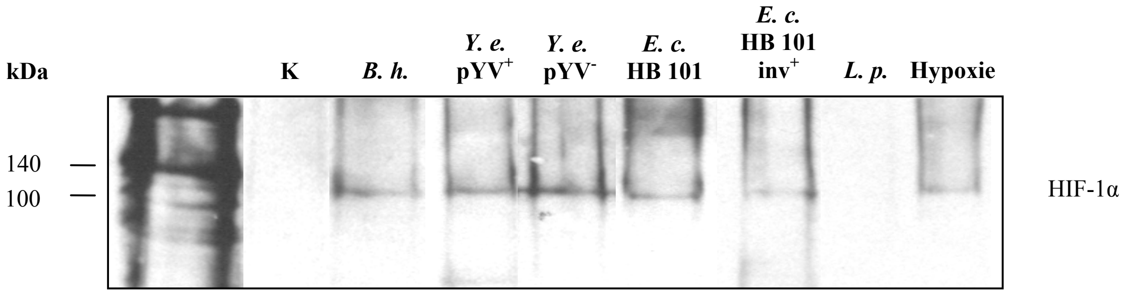


Abb. 33: Nachweis von HIF-1α in HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae, Y. enterocolitica, E. coli* und *L. pneumophila*. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250), *Y. enterocolitica* pYV^+, *Y. enterocolitica* pYV^- (MOI 20), *E. coli* HB 101, *E. coli* HB 101 inv^+ (MOI 100) und *L. pneumophila* (MOI 100) infiziert und nach 6 h lysiert. Die Gesamtzell-Lysate wurden anschließend mittels Western Blot analysiert (anti-HIF-1α: 1:1000) Die Negativkontrolle bestand aus nicht-infizierten Zellen, die Positivkontrolle aus Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden; [entnommen aus der Doktorarbeit: **Ehehalt,U.** (2004) Aktivierung von Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) und Induktion proangiogenetischer Zytokine nach Infektion mit *Bartonella henselae*.].

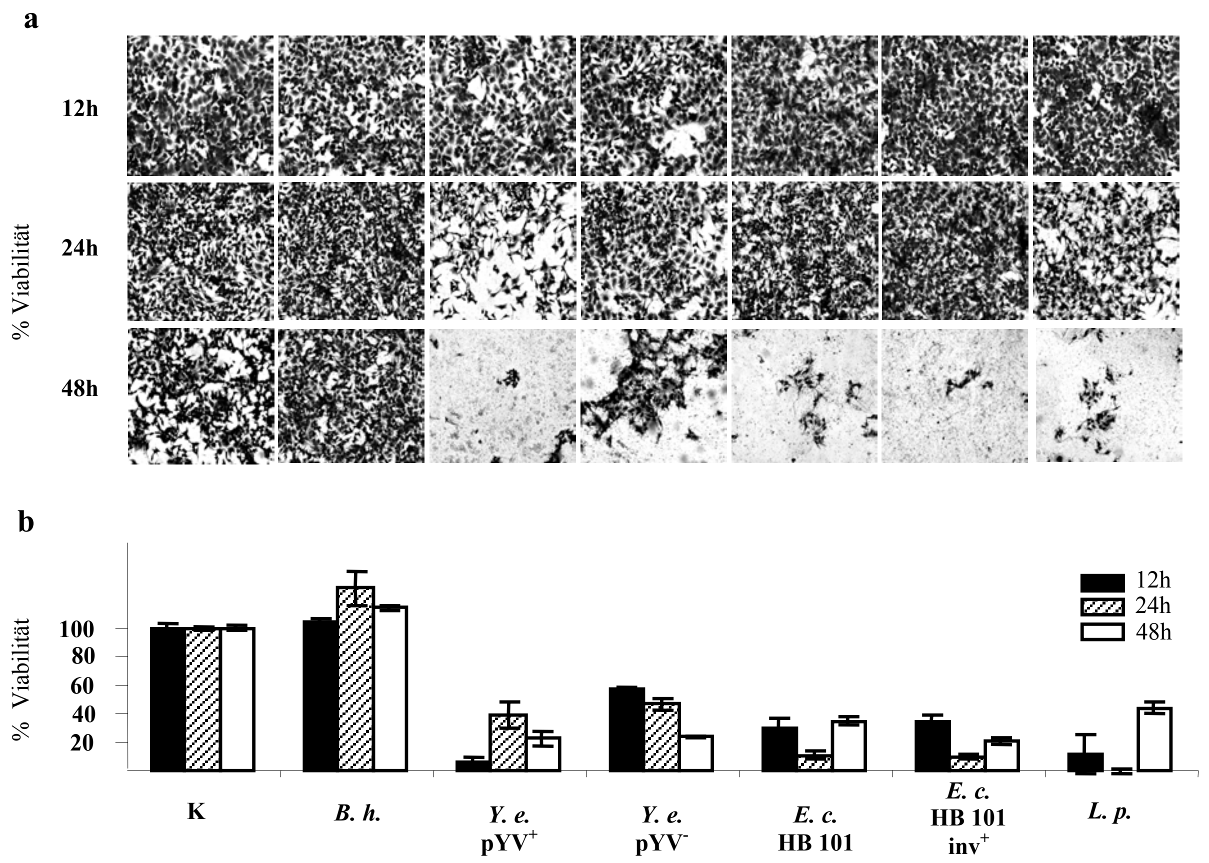


Abb. 34: Messung der Zellviabilität von HeLa-Zellen nach Infektion mit *B. henselae, Y. enterocolitica, E. coli* und *L. pneumophila*. **(a)** Darstellung der Zellviabilität mittels Giemsa-Färbung nach Infektion (12, 24, 48 h) von Hela Zellen mit *B. henselae* (MOI 250), *Y. enterocolitica* pYV$^+$, pYV$^-$ (MOI 20), *E. coli* HB 101, HB 101 inv$^+$ (MOI 100) und *L. pneumophila* (MOI 100). Als Kontrollwert wurden nicht-infizierte Zellen verwendet. **(b)** Messung der Zellviabilität mittels MTS-Assay. HeLa-Zellen wurden mit *B. henselae* (MOI 250), *Y. enterocolitica* pYV$^+$, pYV$^-$ (MOI 20), *E. coli* HB 101, HB 101 inv$^+$ (MOI 100) und *L. pneumophila* (MOI 100) für 12, 24 und 48 h infiziert. Als Kontrollwert wurden nicht-infizierte Zellen verwendet. Nach entsprechender Infektionsdauer wurde die MTS-PMS-Lösung zu den Zellen dazugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Absorption mittels ELISA gemessen. Die Auswertung erfolgte durch Abzug des OD-Wertes von der jeweiligen Versuchsgruppe. Das Ergebnis der Negativkontrolle wurde als 100 % Viabilität definiert und die Ergebnisse der anderen Versuchsgruppen in Relation dazugesetzt; [Daten erstellt von **Fiebig,J.**].

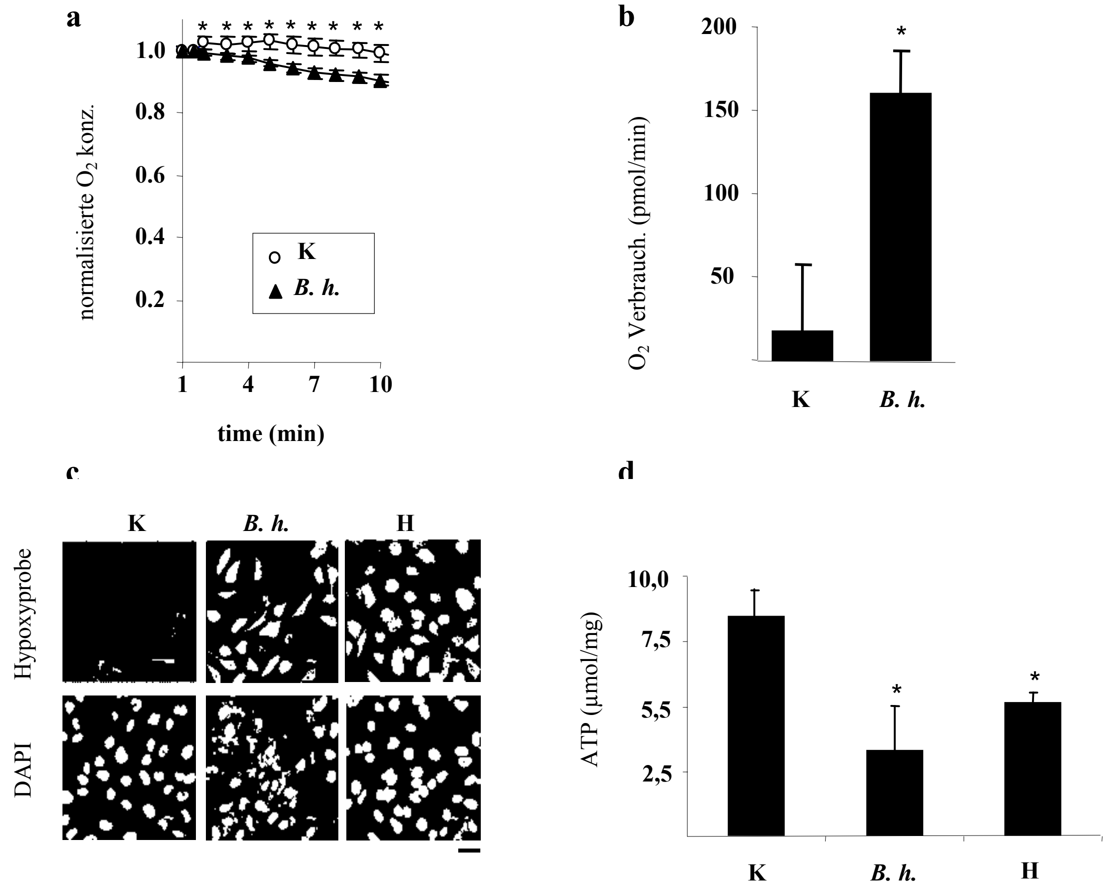


Abb. 35: Infektion mit *B. henselae* führt zu O_2-Verbrauch, Entstehung zellulärer Hypoxie und ATP-Verlust in Wirtszellen. **(a)** Messung der Sauerstoffkonzentration, innerhalb einer Zeitspanne von 10 min im Medium nicht-infizierter und infizierter Hela-Zellen (MOI 1000) 4 h nach Infektion. Die Messung erfolgte über eine „Clark O_2-Elektrode“ in einer geschlossenen, mit Medium gefüllten Kammer. Die gemessenen Werte wurden auf den 1 min nach Verschließen der Kammer gemessenen Wert normalisiert. **(b)** Der Sauerstoffverbrauch wurde anhand der linearen Regression, die aus der Abnahme der O_2-Konzentration ermittelt wurde, für 10^5 Zellen berechnet [Verwendung der Messwerte aus (**a**). Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern aus einer Stichprobe (n = 8)]. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen **(c)** Darstellung der Induktion von Hypoxie in HeLa-Zellen 4 h nach Infektion mittels Pimonidazolhydrochlorid. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde als Primärantikörper ein monoklonaler Pimonidazol-spezifischer Antikörper sowie ein TRITC-markierter Sekundärantikörper (obere Reihe) verwendet. Nuklei und Bakterien wurden mit DAPI gefärbt (untere Reihe). K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, H: Hypoxie-inkubierte Zellen, Skalierung: 20 µm. **(d)** Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde 4 h nach Infektion oder Hypoxie bestimmt. Der ATP-Gehalt wurde auf die Gesamtproteinkonzentration der zellulären Extrakte normalisiert. K: nicht-infizierte Zellen, *B. h.*: *B. henselae*-infizierte Zellen, H: Hypoxie-inkubierte Zellen, Skalierung: 20 µm. *: statistisch signifikanter Unterschied (p < 0,05) zur Negativkontrolle; [entnommen aus: **Kempf, V.A.; Lebiedziejewski, M.; Alitalo, K.; Wälzlein, J.H.; Ehehalt, U.; Fiebig, J.; Schütt, B.; Sander, C.; Müller, S.; Grassl, G.; Brehm, B.; Autenrieth, I.B. (2005)** Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacillary Angiomatosis. Evidence for a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacterial Infections. *Circulation* **111**: 1054-1062].

9. Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Kempf, V.A.; Lebiedziejewski, M.; Alitalo, K.; Wälzlein, J.H.; Ehehalt, U.; Fiebig, J.; Schütt, B.; Sander, C.; Müller, S.; Grassl, G.; Brehm, B.; Autenrieth, I.B. (2005) Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacillary Angiomatosis. Evidence for a Role of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacterial Infections. *Circulation* **111**: 1054-1062

Kempf, V.A.; Schairer, A.; Neumann, D.; Grassl, G.; Lauber, K.; Lebiedziejewski, M.; Schaller, M.; Kyme, P.; Wesselborg, S.; Autenrieth, I.B. (2005) *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell Microbiol* **7**: 91-104

Posterpräsentationen auf wissenschaftlichen Kongressen

Thema: Activation of HIF-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of HIF-1 in bacterial infections.
Veranstaltungen:

- DFG-Forschergruppe ‘Bacterial Cell Envelope: Synthesis, Function and Target’, Workshop on ‘Bacterial Cell Surface’ from March 11-13, 2004 in Tübingen.
- Angiogenesis, Molecular Mechanisms and Functional Interactions 3rd Int Symposium of the German Priority Research Program SPP1069, Kloster Seeon, Germany, 18.–21 Sept. 04.
- 56. Jahrestagung der „Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie“ (DGHM) in Münster vom 26.–29 Sept. 04 (in Zusammenarbeit mit der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie).
- Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät Tübingen Fortüne-Antrag Nr. 1106-1-0, am 19.10.04, Thema: Analyse des durch *B. henselae*-induzierten „angiogenetischen Cocktails“ (mit Posterpreis ausgezeichnet).

Vorträge auf wissenschaftlichen Kongressen

Thema: Activation of HIF-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of HIF-1 in bacterial infections.

Veranstaltungen:

- Blaubeuren, 7./8.04.2002 Forschergruppentreffen der DFG (Antragnummer: FG 449), Bakterielle Zellhülle: Synthese, Funktion und Wirkort.
- Rothenfels, 7./8.04.2003 Forschergruppentreffen der DFG (Antragnummer: FG 449), Bakterielle Zellhülle: Synthese, Funktion und Wirkort.

10. Danksagung

Bei Herrn Dr. Volkhard Kempf möchte ich mich für die exzellente Einarbeitung, Betreuung, das Engagement und für die Bereitschaft bei Fragestellungen mit Ratschlägen hilfreich zur Seite zu stehen, sowie für die kritische und geduldige Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. N. Blin für das Interesse an meiner Arbeit und für die Bereitschaft, diese Dissertation vor der Fakultät für Biologie der Eberhard Karls Universität Tübingen zu vertreten.

Für die ausgezeichnete Kooperationsbereitschaft in diesem Projekt möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Alitalo, Herrn Dr. Schütt, Herrn Dr. Sander, Herrn Dr. Huber und Herrn Dr. Brehm bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Andrea Schäfer, Diana Neumann, Joo-Hee Wälzlein, Urs Ehehalt und Jeannette Fiebig, ohne die die Bearbeitung dieses Themas nie erfolgreich verlaufen wäre.

Bei Herrn Dr. Erwin Bohn möchte ich mich für seine Hilfsbereitschaft und Ratschläge bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch herzlich bei Tanja Riess, Hanna Hartmann, meinem Bruder Jan und meiner Freundin Claudia für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern für die angenehme Zeit im Kaffeeraum bzw. in der Bibliothek bedanken und für das sehr gute Arbeitsklima, das ein angenehmes und erfolgreiches Arbeiten ermöglichte.

Meinen Eltern, die mir nach dem Studium die Doktorarbeit ermöglicht und mich in dieser Zeit unterstützt haben.

11. Lebenslauf

Name:	Maria Gabriela Lebiedziejewski
Geburtsdatum:	30.03.1976
Geburtsort:	Ludwigsburg

Schulausbildung:

1982 – 1986	Hirschbergschule Ludwigsburg
1986 – 1996	Otto-Hahn-Gymnasium Ludwigsburg

Studium:

1996 – 1999	Biologie Grundstudium: Universität Stuttgart-Hohenheim
1999 – 2001	Biologie Hauptstudium: Eberhard Karls Universität Tübingen Fächer: Humangenetik, Immunbiologie, Pharmakologie
2001 – 2002	Diplomarbeit: Einfluss botanischer Substanzen auf die Expression der Kleeblattpeptide. Abschluß: Diplom-Biologin

Promotion:

2002 – 2005	Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Eberhard Karls Universität Tübingen Thema: Analyse der *Bartonella henselae*-induzierten angiogenetischen Wirtszellantwort.